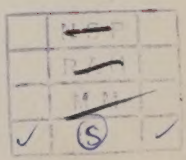
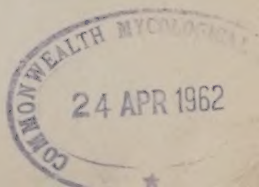
ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. X No 1

1 9 6 1





PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, skrytka pocztowa nr 73.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) muszą być uprzednio akceptowane przez tłumacza Redakcji; należy do nich dołączyć wersję polską i streszczenie w języku polskim. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku polskim oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, dwukropek, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie, 75 odbitek nie zszywanych — po cenie zryczałtowanej (około 2 zł za stronę druku).

* *
*

Zgodnie z poleceniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, w przyszłości prace oryginalne będą publikowane w języku angielskim lub francuskim.

Zmiana ta będzie stopniowo wprowadzana w życie już w 1961 r.

W związku z powyższym objętość prac zostanie ograniczona do maksimum 1 arkusza wydawniczego. Prace mogą być nadsyłane w wersji polskiej z załączonym słownikiem stosowanych terminów fachowych w języku publikacji. Tłumaczenie w takim przypadku wykona Redakcja na koszt autora. Prace przygotowane w wersji obcej muszą uprzednio uzyskać akceptację jednego z tłumaczów Redakcji. Do wersji obcej należy dołączyć 1 egzemplarz w wersji polskiej.

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. X No 1

1961

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek rzeczywisty PAN — Lublin, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Warszawa, Eugeniusz Pijanowski, członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź i S. Bujak, Lublin

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
ODDZIAŁ WROCŁAWSKI

Nakład 1070+140 egz.	Oddano do składania 15. II. 1961 r.
Ark. wyd. 8,75, ark. druk. 7,75.	Podpisano do druku 18. V. 1961 r.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g.	Druk ukończono w maju 1961 r.
Cena zł. 25,–	Nr zam. 57/61. T-5/93.

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10: 3—78

Helena Krzemieniewska

ACRASIEAE

Szkic monograficzny

Z Instytutu Botaniki PAN w Krakowie

Otrzymano: 20 września 1960 r.

Nieliczne organizmy objęte nazwą *Acrasieae* odkrywane były stopniowo począwszy od połowy XIX w. Brefeld (1869) w kulturze nawozowej między licznymi zarodniami grzyba z rodzaju *Mucor* znalazł zarodnie zupełnie do nich podobne, które jednak, jak wykazała bliższa obserwacja, różniły się budową trzonka złożonego z komórek i nagim skupieniem zarodników, a bardziej zasadnicza różnica ujawniła się przy ich kiełkowaniu. Po pęknięciu ściany zarodnika uwalniała się z niego ameba posiadająca jądro i wodniczkę tętniącą. Ameby rozmnażały się przez podział, a po pewnym czasie miały się z sobą zlewać tworząc plazmodium, które następnie owocowało. Organizm ten Brefeld nazwał *Dictyostelium mucoroides* i uznał go za formę pośrednią między śluzowcami a grzybami, przy czym szczególnie bliskim miał być rodzajowi *Mucor*. Według Olive (1902) do rodzaju *Dictyostelium* należy zaliczyć opisany przez Coemansa (1863) organizm określony jako forma piknidalna grzyba z rodzaju *Rhizopus*. Identyczny z *Dictyostelium mucoroides* organizm opisał Sorokin (1871) pod nazwą *Ceratiopodium elegans*, zaliczając go do grzybów, a Rostafiński (1875) w monografii „Śluzowce" stworzył rodzinę *Dictyosteliaceae*, umieszczając ją między śluzowcami w rzędzie *Anemineae*.

Drugi organizm uznany za zbliżony do rodzaju *Dictyostelium* został opisany przez Cienkowskiego (1873) pod nazwą *Guttulina rosea*. Nowe gatunki należące do rodzajów: *Dictyostelium* i *Guttulina*, a także nowe rodzaje: *Acrasis i Coenonia* opisał van Tieghem (1880, 1884).

Badając rozwój znalezionych organizmów, van Tieghem stwierdził, że ich ameby nie zlewają się z sobą, nie tworzą więc plazmodium,

lecz tylko ścisłe skupienia, zachowując w nich swoją indywidualność. Powstały w ten sposób utwór, podobny do plazmodium, nazwał on „plasmode agrégé", a organizmy przechodzące w czasie swego rozwoju stadium tego rodzaju plazmodium nazwał *Acrasieae*. De Bary (1887) uznał *Acrasieae* za rząd równorzędny z rzędem *Myxomycetes* w grupie *Mycetozoa*.

Brefeld (1884) znalazł na nawozie końskim w Rzymie organizm różniący się od *Dictyostelium mucoroides* tylko rozgałęzieniami trzonka, występującymi w okółkach, i zabarwieniem; nazwał go *Polysphondylium violaceum*. W badaniach nad nim poświęcił uwagę skupianiu się ameb i szczególnej budowie trzonka, potwierdził obserwacje van Tieghema, że skupiające się ameby nie zlewają się z sobą, nie tworzą więc plazmodium a pseudoplazmodium, które bezpośrednio prowadzi do owocowania. Wobec tego Brefeld rozróżnił dwie grupy *Myxomycetes*: *plasmodiophori* i *pseudoplasmodiophori*, zaznaczając jednocześnie głębokie różnice zachodzące między nimi. Oprócz tego, że ameby z sobą się nie zlewają, u *Myxomycetes pseudoplasmodiophori* nie ma stadium pływek, a pseudoplazmodium należy już do stadium owocowania, gdy plazmodium *M. plasmodiophori* jest pewną fazą w okresie życia wegetatywnego.

Przegląd znanych gatunków *Acrasieae* podał Zopf (1885), interesując się specjalnie rodzajem *Guttulina* i rozbijając go na dwa rodzaje. Nazwę *Guttulina* zachował dla gatunków opatrzonych trzonkiem; nie posiadające trzonka zaliczył do rodzaju *Copromyxa*; zmienił nazwę całej grupy na *Sorophoreae*. W późniejszej pracy (1892) pod nazwą *Sorophoreae* połączył jako dwa równorzędne rzędy *Acrasieae* i *Labyrinthuleae*.

Nowy rodzaj *Sappinia* opisał i zaliczył do *Acrasieae* Dangeard (1896). Ameby tego rodzaju najczęściej posiadają dwa jądra, a przechodząc w stan spoczynku występują w trzech różnych postaciach. Dangeard traktuje *Acrasieae* jako formę pośrednią między *Rhizopoda* a *Myxomycetes*.

Szereg nowych gatunków opisuje Olive (1901), stosując dla całej grupy nazwę Zopfa *Sorophoreae*, lecz już w opracowaniu monograficznym (1902) powraca do nazwy *Acrasieae*, która ostatecznie się utrwaliła. Olive dzieli grupę *Acrasieae* na trzy rodziny: *Sappiniaceae*, *Guttulinaceae* i *Dictyosteliaceae*, umieszczając na czele rodzinę *Sappiniaceae*, mimo że przynależność rodzaju *Sappinia* do *Acrasieae* budziła w nim pewne wątpliwości.

Monografia Olive zamyka pierwszy okres badań nad *Acrasieae*, po którym nastąpiła w nich długotrwała przerwa, w ciągu której nie spotyka się opisów nowych gatunków, a zainteresowanie znanymi było bardzo nikłe. Nowy okres, ograniczony prawie wyłącznie do badań nad

rodziną *Dictyosteliaceae*, rozpoczynają prace Skupieńskiego (1918, 1920).

Swoisty cykl rozwoju organizmów zaliczanych do grupy *Acrasieae* spowodował potrzebę wprowadzenia nowych terminów. Zopf nazwał nagie skupienie komórek w stanie spoczynku sorusem, a wspierający go trzonek soroforem. Harper (1926) dla utworów często o skomplikowanej budowie, a nie będących wynikiem procesu owocowania, podał nazwę sorokarpu, a dla masy myksameb, przekształcających się następnie w zarodniki, sorogenu.

W opisach gatunków stosuje się powszechnie dla myksameb w stanie spoczynku nazwę zarodników, gdy są pokryte błoną, albo pseudozarodników, gdy jej nie posiadają. Przyjmując, że w ciągu całego rozwoju myksameby nie zatracają swojej indywidualności i nie przechodzą procesu kopulacji, ani żadnego innego procesu zastępczego, wydaje mi się słuszna zmiana terminów zarodnik i pseudozarodnik na mikrocysta i pseudomikrocysta.

Acrasieae van Tieghem

1880. *Bull. Soc. Bot. France*, **27**: 317.

Charakterystyczną cechą organizmów zaliczanych do grupy *Acrasieae* jest podział ich cyklu rozwojowego na dwa okresy: wegetatywny i morfogenetyczny, wyraźnie od siebie odgraniczone. W okresie pierwszym myksameby odżywiają się i rozmnażają, w drugim skupiają się w pseudoplazmodium, a następnie przekształcają się w pseudomikrocysty albo w mikrocysty tworzące nagie skupienie (sorus) i w komórki trzonka o budowie mniej lub bardziej złożonej.

Rodzina *Sappiniaceae* Olive

1902 *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, **30**: 451.

Myksameby o nielicznych szerokich pseudopodiach, przechodząc w stan spoczynku, przekształcają się w pseudomikrocysty.

Jeden rodzaj *Sappinia* Dangeard, jeden gatunek.

Sappinia pedata Dangeard

1896. *Le Botaniste*, **5**: 1.

Myksameby, przechodząc w stan spoczynku, tworzą kilkowarstwowe skupienia albo pojedyncze myksameby, pokrywając się ścianą złożoną z dwu błon: zewnętrznej brunatnej i wewnętrznej bezbarwnej, tworzą cysty na trzonku. Niekiedy myksameby przyjmują postać gruszkowatą, wydłużając się w błonkowaty pusty albo zawierający plazmę trzonek

przytwierdzający je do podłoża w pozycji prostopadłej. Dangeard zwraca uwagę, że jądro myksameb rzadko znajduje się w stanie spoczynku, a wtedy otoczone jest błonką o dwu konturach; najczęściej widać w nich dwa jądra różnie ułożone względem siebie.

W opisie *S. pedata* nie zostały podane rozmiary myksameb ani cyst. Zaliczenie *Sappinia pedata* do grupy *Acrasieae* Dangeard uzasadnia sposobem tworzenia skupień, w których ameby nie zatracają samodzielności.

Olive (1902) dla organizmów znalezionych przez siebie, a uznanych za identyczne z *S. pedata*, podaje rozmiary: pseudomikrocysty: 20-50 μ średnicy, gruszkowate myksameby na trzonkach: do 125 μ wysokie o górnej rozszerzonej części 30-60 μ długiej. Opisał on także formy podobne ale mniejsze, 30-40 μ wysokie, o 15 μ średnicy w górnej części; rozmiary pseudomikrocyst kulistych wynosiły 15-25 μ średnicy. Cyst na trzonkach nie widział.

Bardziej szczegółowy opis dwujądrowych ameb, także pod nazwą *S. pedata*, podał Cook (1939). Ameby, o kształtach nieregularnych, poruszają się bardzo wolno, tworząc nieliczne bardzo szerokie zaokrąglone pseudopodia. Rozmiary ich, gdy przyjmują kształt wydłużony, wynoszą 58,5-70,4 × 23,9 - 37,2 μ. Podział ameb rozpoczyna jednoczesny podział dwu jąder leżących obok siebie. Po podziale jądra rozchodzą się parami złożonymi z jąder powstałych z obu jąder pierwotnych, a wtedy komórka dzieli się przez przewężenie. Ameby tworzą skupienia nie krępujące ich indywidualnego odżywiania się i wzrostu. Przy pogorszeniu się warunków życia ameby zaokrąglają się, przekształcając się w pseudomikrocysty o średnicy 51-55 μ. Cook nie obserwował innych form spoczynkowych opisywanych przez Dangeard i Olive.

Ameby rodzaju *Sappinia* są szeroko rozpowszechnione, lecz rzadko bliżej badane. Znajdowano je we Francji, Ameryce, Rosji i Anglii, zawsze na świeżych albo starych odchodach psa, konia i bydła.

U organizmów opisanych przez wymienionych badaczy skupianie się ameb nie jest warunkiem koniecznym przechodzenia ich w stan spoczynku; pojedyncze ameby, żyjące luźno, mogą również przekształcać się w pseudomikrocysty. Stanowi to argument przeciw zaliczaniu ich do grupy *Acrasieae*. Drugą, może jeszcze ważniejszą przeszkodę, stanowi obecność w amebach we wszystkich stadiach ich rozwoju dwu jąder, co zbliża je do niektórych ameb glebowych.

Z drugiej strony można by się dopatrywać pewnej analogii między gatunkiem *S. pedata* Dangeard (nie Cooka), którego ameby występują czasem na błonkowatym trzonku, a rodzajem *Acytostelium* Raper charakteryzującym się takim samym trzonkiem wytwarzanym przez myksameby skupione w pseudoplazmodium. Czy jest to jednak dosta-

teczny powód do zaliczenia *S. pedata* do grupy *Acrasieae* może roztrzygnąć tylko znalezienie nowych form.

Rodzina *Guttulinaceae* Olive

1902. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.* **30**: 499.

Myksameby, o szerokich zaokrąglonych pseudopodiach albo bez nich, tworzą skupienia mikrocyst albo pseudomikrocyst osadzone na trzonkach albo spoczywające bezpośrednio na podłożu.

Rodzaj *Guttulinopsis* Olive

1902. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.* **30**: 499.

Sorusy siedzące albo wznoszące się na trzonkach. Całość złożona z jednakowych pseudomikrocyst.

Guttulinopsis vulgaris Olive

1902. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.* **30**: 499.

Sorus białawy lub brunatnawożółty, zależnie od stopnia wysuszenia i jakości podłoża. Sorokarp 150-500 μ wysoki, 150-400 μ gruby; najczęściej można w nim wyróżnić trzonek i osadzony na nim sorus, rzadziej sorus siedzący. Pseudomikrocysty kuliste 4-8 μ średnicy. Na odchodach kurcząt i gęsi Olive znajdował odmianę o pseudomikrocystach mniejszych, kulistych, 3-5 μ średnicy, albo owalnych 4-6$\times$5,7 μ, o sorusach większych 200-500 $\times$ 200-700 μ, siedzących albo na krótkich trzonkach.

Guttulinopsis stipitata Olive

1901. *Proc. Amer. Acad. Arts and Sci.* **37**: 336.

Białożółty sorus do 250 μ średnicy, osadzony na trzonku do 800 μ wysokim. Sorus i trzonek zbudowane są z jednakowych pseudomikrocyst, których rozmiary nie zostały podane. Znaleziony na odchodach psa.

Guttulinopsis clavata Olive

1901. *Proc. Amer. Acad. Arts and Sci.* **37**: 336.

Żółtawobiały sorus, 100-400 μ średnicy, złożony z pseudomikrocyst owalnych 3-4 $\times$ 5-7 μ, albo z kulistych 4-5 μ średnicy, wznosi się na trzonku 170-250 μ wysokim. Trzonek składa się z komórek wydłużonych, 3-5$\times$7-10 μ. Po rozproszeniu się pseudomikrocyst sorusa, wydłużone komórki górnej części trzonka pozostają, tworząc coś przypominającego zaokrągloną albo stożkowatą podsadę. Często podstawa trzonka pogrążona jest w śluzie silnie pęczniejącym w wodzie.

Znajdowana w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej na odchodach psa.

Rodzaj *Guttulina* Cienkowski

1873. *Trans. Bot. Soc. 4ty Zjazd Ros. Nat. Kazań.*

Sorus kulisty albo niezupełnie foremny, złożony z mikrocyst, siedzi na podłożu albo wznosi się na trzonku o komórkach nieco zmienionych.

Guttulina rosea Cienkowski

1873. *Trans. Bot. Soc. 4ty Zjazd Ros. Nat. Kazań.*

Różowoczerwony sorus kulisty, do 70 μ średnicy, złożony z mikrocyst kulistych, pokrytych błoną, według Zopfa (1885) delikatnie brodawkowaną, osadzony jest na trzonku o wysokości średnicy sorusa i tak samo jak on zabarwionym. W trzonku ściśle ułożone mikrocysty są kształtu klinowatego. Na tym ogranicza się ich zróżnicowanie.

Znaleziony w Rosji na drewnie pokrytym porostami.

Guttulina aurea van Tieghem

1880. *Bull. Soc. Bot. France* **27**: 317.

Złotożółty sorus złożony z kulistych mikrocyst, 4-6 μ średnicy, osadzony na trzonku.

Gatunek różniący się tylko zabarwieniem od *G. rosea*. Znaleziony we Francji na końskim nawozie.

Guttulina sessilis van Tieghem

1880. *Bull. Soc. Bot. France* **27**: 317.

Mlecznobiały sorus, złożony z mikrocyst owalnych, 4×8 μ, połączonych galaretowatą substancją, spoczywa bezpośrednio na podłożu.

Znaleziony we Francji na psujących się nasionach bobu.

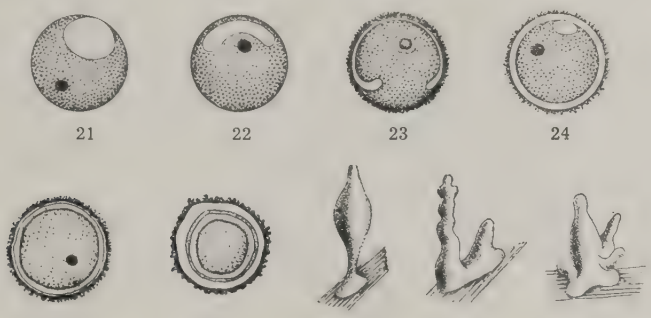
Guttulina protea Fayod

1883. *Bot. Zeitung* **41**: 169.
Protomyxa protea Zopf. *Encyklop. Naturwissenschaften.*

Białożółtawe skupienie 1-3 mm wysokie, nieforemne, złożone z mikrocyst wydłużonych, owalnych, fasolkowatych, niekiedy prawie trójkątnych, o rozmiarach 9×14 μ, jednakowych w całym skupieniu, dzielącym się niekiedy na sorus i trzonek.

Mikrocysty przerastają w świeżym wyciągu z nawozu; nie wystarcza do tego celu woda. Myksameby, 16-22 μ długie, poruszają się szybko,

posuwając się w ciągu sekundy o $^1/_4$-$^1/_5$ swojej długości. Poza ruchem pełzającym Fayod obserwował szczególne zjawisko gwałtownego ruchu na granicy kropli pożywki, jak gdyby skoków na odległość 2-4-krotnej długości ciała, czemu towarzyszy szybko zanikające zaokrąglenie się myksameby. Pseudoplazmodium nie powstaje, myksameby skupiają się około gotowej mikrocysty, a wpełzając na nią, a także jedne na drugie, stopniowo przekształcają się w mikrocysty. Takie skupienia tworzą się tylko w atmosferze stosunkowo suchej, nigdy w bardzo wilgotnej.



Rys. 1. *Guttulina protea* Fayod, a, b, c — sorokarpy, × 12; 21 - 31 — formowanie się cyst, × 1000 (wg Fayod, *Bot. Zeit.*, **41**, tab. II, 1883)

Jeżeli warunki są niekorzystne, np. zbyt silny rozwój bakterii, myksameby tworzą mikrocysty (rys. 1.) 12-15 μ średnicy, pokryte błoną, wewnątrz której widoczna jest duża wodniczka rozlewająca się stopniowo wokół treści, oddzielając ją od błony. Odwadniając cystę, można uwidocznić wewnętrzną błonkę otaczającą protoplast. W kulturach na podłożach czystych zewnętrzna błona jest bezbarwna, w kulturach na nawozie lub w jego wyciągu zabarwia się aż do zbrunatnienia. Obie błony nie dają reakcji na celulozę, rozpuszczają się trudno w kwasie siarkowym. Te mikrocysty są odporne na wysychanie i w tym stanie przez dłuższy czas zachowują zdolność przerastania.

Fayod Znajdował *G. protea* w Niemczech na nawozie końskim i bydlęcym.

Rodzaj *Acrasis* van Tieghem

1880. *Bull. Soc. Bot. France* **27**: 317.

Na wierzchołku trzonka wznoszą się pojedyncze lub rozgałęzione łańcuszki, złożone z mikrocyst. Komórki wchodzące w skład trzonka nie zatracają żywotności.

Acrasis granulatum van Tieghem

1880. *Bull. Soc. Bot. France* 27: 317.

Na trzonku, złożonym z jednego rzędu wydłużonych komórek, znajduje się łańcuszek różnej długości, złożony z mikrocyst, 10-15 μ średnicy, ciemno-fioletowo-brunatnych, pokrytych błoną z celulozy o powierzchni chropawej. Dolna komórka trzonka rozpłaszczona na podłożu. Czasem trzonki połączone są między sobą na podobieństwo koremium, lecz każdy posiada własny łańcuszek mikrocyst.

Van Tieghem obserwował rozwój tego organizmu na szkiełku w kropli świeżego moczu. Myksameby zbierają się blisko brzegu kropli, stykają się z sobą, układają jedne na drugich, tworząc stożkowate, wydłużające się skupienie, wewnątrz którego powstaje trzonek z komórek pokrytych błoną z celulozy. Na jego wierzchołku myksameby zaokrąglają się, pokrywają błoną, tworząc łańcuszek.

Wysokość trzonka, jak ilość mikrocyst w łańcuszku, zależna jest od warunków: sorokarpy powstające w kropli mają trzonki wyższe niż znajdujące się na jej brzegu, a na wilgotnym szkle znajdują się tylko skupienia mikrocyst. Gdy warunki rozwoju były niekorzystne myksameby tworzyły cysty przez pączkowanie: myksameba wypuszcza pseudopodium, które się zaokrągla, zwęża się u podstawy, w końcu odrywa się, pokrywając się błoną. Pączkowanie powtarza się parokrotnie, póki się nie wyczerpie cała treść (van Tieghem 1880).

Gatunek ten został znaleziony we Francji na drożdżach, na których hodowano *Dictyostelium roseum*.

Acrasis rosea Olive L. S. *et* Stoianovitch

1960. *Bull. Torrey Botan. Club*, 87: 1.

Sorokarp różowy, składa się z trzonka i jednego lub więcej łańcuszków prostych albo rozgałęzionych, złożonych z mikrocyst prawie kulistych, 7,2-13,5×8,1-15,3 μ, pokrytych błoną zawierającą celulozę, opatrzoną pierścieniowym zgrubieniem w miejscu łączenia się mikrocyst w łańcuszki. Trzonek jest rzędem komórek, albo niezupełnie foremnym pniem, do 100 μ średnicy, do 780 μ wysokim. Mikrocysty wchodzące w skład trzonka zachowują swój protoplast i zdolność przerastania; przeniesione na nowe podłoże dają nową kulturę.

Mikrocysty przeniesione do kropli wody na płytce agarowej kiełkują w ciągu godziny; zaróżowiona myksameba wydostaje się przez wydłużoną szparę, pozostawiając pustą błonę. Barwik czerwony znajduje się tylko w wewnętrznej części protoplastu, obok jądra, centralnego ciałka, przypuszczalnie jąderka, i jednej lub dwu wodniczek tętniących. Ektoplazma jest od barwika wolna. Myksameby poruszają się po podłożu, tworząc szerokie, zaokrąglone pseudopodia. Rozmiary myksameb wahają się

w szerokich granicach, przeważnie wynoszą 8-18 × 9,5-20 μ, dochodzą jednak do 43 μ średnicy, a niezupełnie kształtne osiągają 50 × 66 μ. Rozmnażają się przez podział; nie obserwowano cyklu płciowego; z jednej mikrocysty łańcuszka można otrzymać kulturę tworzącą sorokarpy. Nie obserwowano bezpośrednio gromadzenia się myksameb w pseudoplazmodium. Po upływie nocy, rano między 8 a 9 godziną, znajdowano nieruchome skupienia myksameb, które po jednej lub dwu godzinach dawały sorokarpy. W skupieniu myksameb następuje zróżnicowanie na kulisty, ameboidalny sorogen i na ocystowane komórki trzonka, pokrywającego się jednocześnie błonką. W trzonkach, złożonych tylko z jednego rzędu komórek, są one nieco wydłużone i spłaszczone z obu stron. W trzonkach grubszych mikrocysty są tylko gdzieniegdzie z różnych stron spłaszczone; istnieją między nimi wolne przestrzenie i nie zatracają one swojej różowej treści. Sorogen dzieli się na części; w każdej z nich myksameby układają się w łańcuszek i okrywają cystą. Gdy w pewnym miejscu łańcuszka nastąpi skupienie paru myksameb, powstają wtedy krótkie boczne łańcuszki. Tworzenie łańcuszków odbywa się bardzo szybko — w ciągu 20-30 minut. Niekiedy myksameby sorogenu ocystowują się na wierzchołku w skupieniu, nie tworząc łańcuszków.

Acrasis rosea został wyhodowany ze starych owocostanów *Phragmites communis* Trim., *Andropogon* i innych traw wraz z różnymi grzybami na pożywce agarowej z mąką, glikozą i 2% wyciągiem z drożdży. W celu redukcji rozwoju bakterii dodano 4 mg streptomycyny i 20 000 jednostek penicyliny na litr pożywki. Najodpowiedniejszym pożywieniem dla *A. rosea* są komórki *Rhodotorula mucilaginosa* i *Flavobacterium*, a także konidia *Phoma*.

W ciemności myksameby rozmnażają się, ale nie tworzą sorokarpów, nawet wtedy gdy następnie znajdą się na świetle. Na jednostronne oświetlenie nie reagują. W kulturze z *Flavobacterium* utrzymują się przy życiu w ciągu miesiąca. Mikrocysty i sorokarpy trzymane w temperaturze 23° ginęły; kultura złożona z myksameb trzymana w temperaturze 8° zachowała swoją żywotność. Temperatura 30° jest zabójcza.

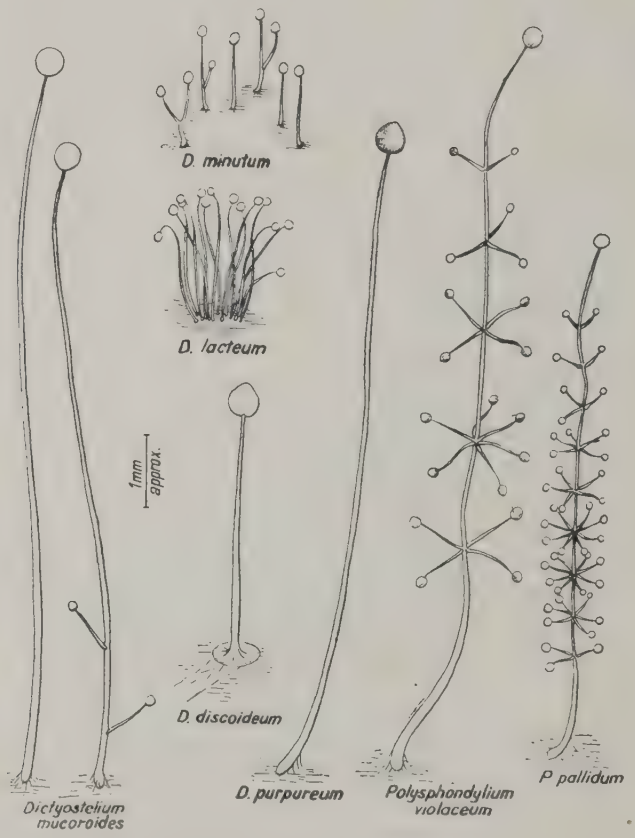
W rozważaniach nad stanowiskiem rodzaju *Acrasis* w systemie Olive i Stoianovitch dochodzą do wniosku, że właściwe jego miejsce znajduje się w rodzinie *Guttulinaceae*, z którą go łączy wygląd myksameb i brak wyraźnego zróżnicowania mikrocyst, wchodzących w skład trzonka.

Rodzina *Dictyosteliaceae* Rostafiński

1875. *Monografia Śluzowce*: str. 217.

Myksameby skupiają się w pseudoplazmodium (rys. 2), a następnie budują sorokarp o trzonku prostym albo rozgałęzionym, którego wierzchołek obejmuje sorus. Podobne sorusy znajdują się na wierzchołkach

rozgałęzień. Trzonek i gałązki zbudowane są z komórek obłonionych, pozbawionych treści.



Rys. 2. Różne gatunki rodziny *Dictyosteliaceae* (wg Raper, *Quart. Rev. Biol.*, 26, 1951)

Rozwój rodzajów należących do rodziny *Dictyosteliaceae* można podzielić na trzy albo cztery wyraźnie wyróżniające się okresy: Pierwsze dwa: wegetatywny i skupiania się myksameb w pseudoplazmodium (agregacja), u wszystkich rodzajów badanych przebiegają podobnie. Różnice związane z poszczególnymi rodzajami, a nawet gatunkami, występują dopiero w okresie trzecim — ruchów pseudoplazmodium (migracja) i czwartym — budowy trzonka i formowania się skupień mikrocyst i sorusów, a więc budowy sorokarpu (kulminacja).

Mimo, że znajomość różnych rodzajów i gatunków nie jest równomierna, można stwierdzić, że w dwu pierwszych okresach życia nie ma między nimi zasadniczych różnic. Wobec tego wydaje się słuszne wspólne ich omówienie.

Okres wegetatywny. Pierwszym objawem kiełkowania jest pęcznienie mikrocysty, przy czym grubość jej powiększa się wydatniej niż długość (Brefeld 1869, Arndt 1937). Sposób, w jaki wydostaje się z błony mikrocysty myksameba, nie jest jednakowy; przeważnie ściana mikrocysty pęka podłużnie, niekiedy jednak, np. u mikrocyst *Dictyostelium polycephalum,* pęknięcie przebiega po linii równikowej, ściana rozpada się na dwie lub więcej części (Raper 1956a).

Warunkiem koniecznym kiełkowania mikrocyst jest ich zwilżenie wodą (Skupieński 1918); według niektórych badaczy korzystniej działają wyciągi z nawozów lub roztwory zawierające związki fosforowe i organiczne (Potts 1902). Drugim warunkiem jest odpowiednia temperatura, minimum około 7°. Światło na kiełkowanie nie wywiera wpływu. Wbrew poglądowi Pinoy (1907), Oehlera (1922), Schuckmana (1925), obecność bakterii nie wpływa na przebieg kiełkowania. Stwierdzili to Skupieński i Arndt dla mikrocyst *D. mucoroides,* a następnie potwierdzili to inni także dla innych gatunków.

Według Russella i Bonnera (1960) na kiełkowanie mikrocyst wpływa ich zagęszczenie na podłożu. Gdy ilość mikrocyst *D. mucoroides* na 1 mm² powierzchni wynosiła 33, procent wykiełkowanych po 4 godzinach był bliski 100. Procent ten zmniejszał się wraz ze wzrostem zagęszczenia. Obserwacje te nasunęły przypuszczenie, że istnieje substancja hamująca kiełkowanie, stanowiąca zatem ochronę przed nim w obrębie sorusa.

Uwolnione z błony mikrocysty myksameby są bezbarwne, wykazują pewne zróżnicowanie treści na ziarnistą endoplazmę i bezziarnistą ektoplazmę, tworzącą mniej lub bardziej wydłużone pseudopodia. W endoplazmie pogrążone jest jądro i jedna lub dwie wodniczki tętniące, pracujące na przemian, a gdy myksameby zaczynają się odżywiać — pojawiają się wodniczki trawiące.

Takeuchi (1960) zwrócił uwagę na różnice w wyglądzie myksameb żerujących i głodujących. Pierwsze posiadają kształt mniej więcej zaokrąglony, a tworząc podobne pseudopodia, poruszają się powoli. Głodujące poruszają się szybko, pseudopodia ich są wydłużone, cienkie. Występują także różnice w wyglądzie mitochondrii. U pierwszych mitochondria mają kształt ziarenek, u głodujących postać nitek. Myksameby bezpośrednio po wykiełkowaniu są podobne do głodujących.

Błona plazmatyczna, pokrywająca myksameby, jest w różnym stop-

niu przepuszczalna dla nieelektrolitów, które mogą służyć im za pokarm. Stwierdzili to Faust i Filosa (1959) za pomocą metody fotoelektrycznej Mawego (1956) u myksameb *D. mucoroides*. Niektóre związki, jak np. glicerol, przenikają do wnętrza bardzo szybko; glicyna, 1-cysteiny-HCl — wolniej, a dla glikozy, sacharozy i 1-argininy błona plazmatyczna jest nieprzepuszczalna. Badania metodą fotoelektryczną nie wpływają szkodliwie na myksameby.

Zmienny kształt myksameb utrudnia określenie ich rozmiarów, które w ciągu rozwoju w różnych jego okresach ulegają zmianie (Bonner, Frascella 1953). Utrudnia to także stwierdzenie budowy biegunowej myksameb. Dopiero w czasie skupiania się, gdy myksameby, wydłużając się, poruszają się w kierunku pewnego centrum, występuje różnica między stroną przednią a tylną. Po przeniesieniu centrum na stronę przeciwną nie następuje prosta zmiana kierunku ruchu ale powstaje w przedniej części myksameby pseudopodium, które wyginając się, zwraca ją w kierunku przeciwnym (Bonner 1950). Po stronie przedniej znajduje się więcej hyaloplazmy i w tej części w pobliżu środka znajduje się jądro. Przy pomocy mikroskopu elektronowego (Gazelius, Rånby 1957) w preparatach myksameb *D. discoideum* utrwalonych parą kwasu osmowego stwierdzono obecność czarnych inkluzji lipoidów i mitochondrii, a obok jądra dwa jąderka ułożone biegunowo. Na jądrze widoczne było przyczepione do jego powierzchni ciałko, którego obecność stwierdził także Bodian (według Bonnera 1959) w preparatach impregnowanych srebrem. Znaczenie ciałka nie jest jasne, nie można go łączyć z budową biegunową komórki, gdyż położenie jego na jądrze jest różne. Błona jądrowa nie jest widoczna w preparatach utrwalonych parą kwasu osmowego i barwionych mieszaniną Giemzy; można ją uwidocznić, barwiąc preparat hematoksyliną żelazistą i zielenią jasną (Schuckman 1925).

Myksameby rozmnażają się przez podział, poprzedzony podziałem jądra, odbywającym się w czasie, gdy zaokrąglone pozostają jakiś czas w spokoju. Po podziale jądra myksameba dzieli się przez przewężenie na dwie równe części (Brefeld 1869).

Olive (1902) rozróżniał dwa rodzaje podziału jądra. Pierwszy po uwolnieniu się myksameby z błony podział jądra odbywa się bardzo powoli, w ciągu 12-24 godzin. W młodej myksemebie widział jedno ciałko kuliste albo skupienia podobnych ziarenek na obu końcach komórki. Ziarenka układają się w łańcuszek, następnie skupiają się w jedno ciałko przypominające jądro. Apochromatycznego wrzeciona nie obserwował, dostrzegał tylko rozchodzące się pałeczki, które uznał za chromosomy, a cały proces za mitotyczny podział jądra. Następne podziały myksameb, a więc i jąder, o ile warunki są korzystne, odbywają się

bardzo szybko, z tego powodu Olive traktuje je jako podziały amitotyczne. Dalsze badania nad rozmnażaniem się myksameb *D. mucoroides* nie potwierdziły obserwacji Olive. Wszystkie podziały jądra są mitotyczne; stwierdził to Skupieński (1920), a następnie potwierdzili to inni badacze dla innych gatunków.

Ilość chromosomów w jądrach różnych gatunków nie jest jednakowa. W skład jądra *D. mucoroides* wchodzą 4 chromosomy (Skupieński 1920), taką samą ilość lecz złożoną z siedmiu ramion znaleziono w jądrach *D. discoideum* (Bonner, Frascella 1952). W tym samym roku Wilson w jądrach myksameb tego samego gatunku wyróżnia 7 chromosomów, a w jądrach *Polysphondylium violaceum* 8 albo 9 (Wilson, Ross 1957).

Dla rozwoju wszystkich gatunków należących do rodziny *Dictyosteliaceae* obecność tlenu w otaczającej atmosferze jest konieczna. Zmniejszenie jego ciśnienia powoduje zwolnienie rozwoju, a całkowite wykluczenie hamuje go. Gdy chodzi jednak o rozmnażanie się myksameb, to poglądy nie są zgodne. Potts (1902) stwierdza, że mikrocysty wysiane wraz z bakteriami i trzymane w próżni nie kiełkowały lecz przeniesione po miesiącu w warunki normalne dały normalną kulturę. Oehler (1922) stwierdza kiełkowanie i następnie rozmnażanie się myksameb *D. mucoroides* w atmosferze czystego azotu. Rozmnażanie się myksameb *D. discoideum* w kulturze trzymanej 48 godzin w eksykatorze próżniowym obserwowały Wright i Anderson (1958). Bradley, Sussman i Ennis (1956) nie stwierdzili, aby w tych warunkach odbywało się rozmnażanie myksameb. Jednakże krótkotrwały, a nawet 48-godzinny pobyt kultury *D. discoideum* w atmosferze czystego azotu albo w próżniowym eksykatorze nie wpływał szkodliwie na dalszy rozwój już w warunkach atmosfery normalnej.

Wpływem obecności CO_2 na rozwój *D. mucoroides* interesował się Potts, a następnie Cohen (1953). Wyniki ich obserwacji nie były zgodne. Pierwszy z nich nie stwierdził wpływu CO_2 w okresie zarówno wegetatywnym, jak i morfogenetycznym, natomiast Cohen podaje, że w atmosferze pozbawionej CO_2 wskutek obecności NaOH rozwoju nie było.

Głównym i przypuszczalnie jedynym pożywieniem myksameb są bakterie. Już pierwsi badacze, jak Brefeld, Potts, Olive, widzieli pochłanianie bakterii przez myksameby, ale nie przywiązywali do tego większego znaczenia, przyjmując, że jako komórki nieobłonione korzystają one z substancji odżywczych na drodze osmotycznej. Przypuszczenie to nie znalazło potwierdzenia. Doświadczenia, przede wszystkiem Rapera (1937), wykazały, że myksameby *D. discoideum* nie są zdolne do korzystania z substancji odżywczych znajdujących się

w wyciągach nawozu, marchwi, ziemniaka i drożdży, jak i z pożywek syntetycznych zawierających różne cukry i pepton. Do pewnego stopnia wyjątkiem był wyciąg z grochu kanadyjskiego i pożywka zawierająca 1% laktozy i 3-5% peptonu. Na wyciągu z grochu myksameby rozmnożyły się, ale dalszego rozwoju nie było. W pożywce z laktozą i peptonem rozmnażanie było słabe, jednakże mimo że myksameb było mało, skupiły się i dały drobne sorokarpy.

Oprócz pochłaniania bakterii Potts obserwował zmiany zachodzące w koloniach bakterii atakowanych przez myksameby, występowanie w nich form inwolucyjnych; przypuszczał więc, że posiadają one enzymy niszczące bakterie i korzystają głównie z produktów ich rozkładu. Nie ma żadnego dowodu, aby myksameby zabijały bakterie przed ich pochłonięciem, ale stwierdzono, że mogą się one żywić bakteriami martwymi, tylko sposób ich zabicia nie jest obojętny. Nie korzystają z bakterii zabitych przez alkohol lub eter, natomiast chloroform, użyty do tego celu, nie wpływa ujemnie na ich spożycie (Potts). Myksameby *D. discoideum* żywione bakteriami zabitymi za pomocą promieni ultrafioletowych albo przez krótkotrwałe (10 minut) ogrzewanie w autoklawie rozwijały się normalnie i budowały sorokarpy (Raper 1937). Dowodem możności żywienia się myksameb martwymi bakteriami, albo może i innymi mikroorganizmami, przez czas nieograniczony, są doświadczenia Singha (1947b). Glebę wyjałowioną przez dwugodzinne ogrzewanie w autoklawie szczepił mikrocystami albo myksamebami *D. mucoroides* i *D. giganteum*. Zależnie od stopnia wilgotności gleby pojawiały się w różnym czasie sorokarpy obu gatunków.

Nadson (1899), który pierwszy zwrócił uwagę na stałe występowanie *D. mucoroides* w towarzystwie *Pseudomonas fluorescens* uznał to za zjawisko symbiozy. Podobnie jako symbiozę traktuje go Pinoy (1903) i Skupieński, który nawet stwierdza silniejszy wzrost *Ps. fluorescens var. liquefaciens* w obecności *D. mucoroides*, obserwuje skupienie się bakterii około myksameb w okolicy wodniczki, co nasuwa mu przypuszczenie, że odbywa się wydzielanie jakiejś substancji dla nich korzystnej. Vuillemin (1903) nazywa myksameby „bakteriofagami". Ostatecznie sprawę rozstrzygnęły hodowle *D. discoideum* z kilkudziesięciu gatunkami bakterii, w których określano wartość odżywczą różnych gatunków, obliczając ilość powstałych w kulturze sorokarpów (Raper 1937, Raper, Smith 1939). Silne rozmnażanie się myksameb i normalny dalszy rozwój odbywał się w kulturach z bakteriami bezzarodnikowymi, gramnegatywnymi, Do najodpowiedniejszych należały: *Ps. fluorescens, Escherichia coli, Aerobacter aerogenes*, najsłabiej wypadły kultury z *Ps. aeruginosa, Cellulomonas fima* i *Bacillus mycoides*, chociaż w kulturach z *B. subtilis* i *B. megatherium* wyrastały

obfite i dorodne sorokarpy. Nieprzydatnymi dla myksameb są bakterie tworzące duże ilości śluzu. Pochłoniętą bakterię otacza wodniczka, w niej ulega ona pęcznieniu, rozpadowi na części i strawieniu. Zarodniki zostają wydalane na zewnątrz. Wobec tych doświadczeń nie można dopatrywać się współżycia myksameb z bakteriami, nie można także tego stosunku określić jako pasożytniczego, trzeba przyjąć po prostu, że bakterie są pożywieniem dla myksameb.

Próbę bliższej charakterystyki bakterii „jadalnych" i „niejadalnych" podjęli Slifkin i Gutowsky (1958). Opierając się na obserwacjach Stevensona i Bolduana, że widma absorpcyjne różnych bakterii w świetle infraczerwonym są różne i zmieniają się w związku z pożywką, przeprowadzili oni porównanie widm myksameb z widmami bakterii służących im za pożywienie. Okazało się, że dobrym pożywieniem są bakterie posiadające takie samo widmo jak myksameby, nieprzydatnymi — dające widmo odmienne. Podobieństwo czy identyczność widm absorpcyjnych wskazuje na podobieństwo składu chemicznego. Czy podobieństwo to decyduje o właściwościach odżywczych, czy też zbieżność ta jest przypadkowa, mogą rozstrzygnąć tylko dalsze badania. Po potwierdzeniu wyników badań Stevensona i Bolduana stwierdzono, że wraz ze zmianą składu pożywki zmienia się wartość odżywcza bakterii, np. *Aerobacter aerogenes* hodowany na pożywce Bonnera jest dobrym pożywieniem dla myksameb *D. discoideum*, hodowany na pożywce Czapeka nie jest przez nie zużywany. Przykład drugi: *Bacillus subtilis* pochodzący z pożywki z wyciągiem ziemniaka i glukozą jest dobrym pożywieniem, z pożywki Bonnera złym.

W celu wyjaśnienia, jaki składnik ciała bakterii jest czynnikiem decydującym o życiu myksameb, zostały przeprowadzone doświadczenia (Bradley, Sussman 1952, Sussman, Bradley 1954) z ekstraktami różnych bakterii, stosowanych najczęściej z dobrym rezultatem w kulturach z różnymi gatunkami rodzaju *Dictyostelium*, a także bakterii nie nadających się do hodowli myksameb. Bakterie hodowano na pożywce agarowej zawierającej glukozę i pepton. Po 72 godzinach bakterie zmywano wodą, odwirowywano i zamrażano. Po roztarciu z suchym lodem ekstrahowano je dwukrotnie wodą. Ekstrakt był nieczynny. Pozostałość po ekstrakcji wodnej zalewano trzykrotnie roztworem NaOH o $pH = 9{,}5$. Gdy czysty wyciąg alkaliczny zobojętniono, wytrącił się biały osad, który zalano 95% alkoholem, następnie po godzinie przemyto acetonem i eterem. Suchy biały proszek rozpuszczał się w wodzie bez reszty. Roztwór był czynny i zachowywał swoje właściwości odżywcze nawet po ogrzaniu w autoklawie, gdy roztwór alkaliczny po 4-5 godzinach nawet w niskiej temperaturze stawał się nieprzydatny. Analiza wykazała, że wyekstrahowana substancja

składa się z 16 aminokwasów i pod wpływem trypsyny staje się nieczynną. Jej wartość odżywcza dla myksameb polega prawdopodobnie na jakimś szczególnym wiązaniu peptydowym nie występującym u bakterii gram-dodatnich.

W suchej masie *Aerobacter aerogenes* czynnik odżywczy całkowicie oczyszczony wynosił 5,8-6,2% s.m. W wyciągu z *Escherichia coli* i *Pseudomonas putida* otrzymany osad po neutralizacji pierwszego alkalicznego ekstraktu wynosił 8,4% i 9% s. m.

Ekstrakt umożliwiał rozwój myksameb, rozwój ten był jednak słabszy w porównaniu do kultury w obecności odpowiednich bakterii. Bonner (1959b) wspomina, że próba powtórzenia tych doświadczeń nie powiodła się.

Po okresie wegetatywnym trwającym zależnie od warunków krócej lub dłużej, zwykle kilka dni, gdy źródło pożywienia zaczyna się wyczerpywać, myksameby przechodzą do drugiego okresu swego rozwoju — skupiania się. Okres wegetatywny można jednak przedłużyć przez czas nieograniczony, dodając do kultury odpowiednio często zawiesinę bakterii albo przenosząc myksameby na nową pożywkę. W ten sposób Potts (1902) hodował myksameby *D. mucoroides* przez $3^1/_2$ miesiąca, a Raper (1940b) *D. discoideum* przez czas nieograniczony, dodając co 36 godzin zawiesinę bakterii.

W pewnych jeszcze nie określonych warunkach pojedyncze myksameby niektórych gatunków przechodzą w stan spoczynku w postaci mikrocyst. Występowanie mikrocyst obserwowali Blaskovics i Raper (1957) w kulturach *D. mucoroides, D. polycephalum, D. minutum, Polysphondylium pallidum.*

O wiele rzadszym zjawiskiem są badane przez wymienionych badaczy makrocysty spotkane tylko w kulturach jednego z wielu szczepów *D. mucoroides „28“*. W jednej i tej samej kulturze obok normalnie wykształconych sorokarpów pojawiły się makrocysty powstające z formującego się pseudoplazmodium. Normalne skupienie myksameb rozpadało się na części otaczające się cienką błonką celulozową — makrocysty, a następnie wszystkie makrocysty razem pokrywały się grubą błoną złożoną przeważnie z celulozy. Czasem przed powstaniem grubej wspólnej błony makrocysty dzielą się na części, z których każda pokrywa się błonką. Wewnątrz tych najmniejszych części makrocysty, przed ostatecznym zamknięciem ich zewnętrzną błoną, pojedyncze myksameby pokrywają się błonką, tworząc tzw. endocystę. Endocysty początkowo wskutek wzajemnego ucisku są polyedryczne, z czasem maleją i stają się kuliste lub nieco eliptyczne. Rozmiary endocyst wynoszą 3,6-4,8 μ średnicy, czyli są one mniejsze prawie o połowę od tworzących je myksameb. Zmniejszenie rozmiarów mogło nastąpić przez

częściową utratę wody i substancji zużytej na budowę błon, a może wskutek podziału przed przekształceniem się myksameby w endocystę. Rozmiary makrocyst są bardzo różne, zależnie od ilości w nich endocyst.

W ciągu 2-3 tygodni można w makrocystach widzieć endocysty. Po tym czasie treść makrocysty staje się jednorodna, a w ciągu 4-6 tygodni kurczy się ona do 60-75% pierwotnej objętości, tworząc zbitą brunatną masę w środku częściowo pustej błony. Gdy taka makrocysta zostaje rozgnieciona w wodzie, wypływa z niej treść zawierająca drobne cząstki wykonujące ruch Browna.

Makrocysty umieszczone w wodzie zachowują się różnie zależnie od wieku i temperatury. Przed przeprowadzeniem przerastania makrocyst należało oczyścić je z myksameb mogących znajdować się na ich powierzchni, do czego wystarczy ogrzanie do 42° w ciągu 5-10 minut. Dla ułatwienia przerastania pozbywano się grubej celulozowej błony. Tak przygotowane makrocysty przerastały w wodzie w różnym czasie, zależnie od temperatury. Przy 10° po 72 godzinach widoczne było pęcznienie, a po 10 dniach liczne myksameby i puste błony. W temperaturze 15° po 10 dniach pokazały się tylko nieliczne myksameby, a w temperaturze 20-25° nie było widać pęcznienia, ani pustych błon. Najłatwiej przerastały makrocysty 10-dniowe w temperaturze 15°, po pęknięciu błon wydostawały się myksameby. Makrocysty w wieku 6-8 tygodni, w których nie można było już wyróżnić endocyst, trzymane na płytkach agarowych w różnych temperaturach (10-25°) przerosły tylko znajdujące się w temperaturze 10°, dając myksameby.

Czynnikiem decydującym o powstaniu makrocyst wydaje się właściwość genetyczna. W kulturach agarowych z wyciągiem z siana i w obecności *Escherichia coli* można było, zmieniając temperaturę, zmienić stosunek ilości makrocyst do występujących jednocześnie sorokarpów. Gdy temperatura wzrastała do 24-25°, stosunek ten wzrastał, w temperaturze 20° malał. Pojedyncze mikrocysty z sorusa szczepu „*28b*" dawały kultury zachowujące się rozmaicie wobec zmian temperatury. Jedne w temperaturze 20° dawały same makrocysty, inne — same sorokarpy, niektóre w temperaturze 15° — obfite sorokarpy, a nieliczne makrocysty, w temperaturze 25° — sorokarpy i makrocysty.

Tworzenie makrocyst wydaje się cechą genetyczną ujawniającą się rzadko, może tylko w warunkach hodowli. Jest ono zjawiskiem bardzo interesującym, szczególnie ze względu na zanikanie endocyst i następnie pojawianie się myksameb. Wyjaśnienie zagadnienia makrocyst, wymagające jeszcze badań cytologicznych, mogłoby może zmienić wyobrażenie o rozwoju rodziny *Dictyosteliaceae*.

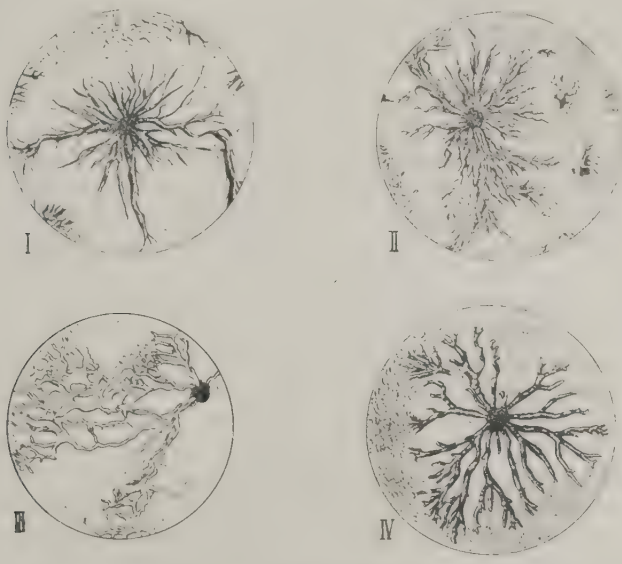
Powstawanie pseudoplazmodium — agregacja. Obserwacje skupiania się myksameb w pseudoplazmodium przeprowa-

dzano początkowo (Brefeld, Potts, Olive, Skupieński, Arndt) bezpośrednio w kulturach. Późniejsi badacze, korzystając z tego, że w tym okresie myksameby nie odżywiają się, badali tworzenie się pseudoplazmodium na materiale odpowiednio przygotowanym. Myksameby spłukiwano z powierzchni kultury agarowej wodą, otrzymaną zawiesinę kilkakrotnie odwirowywano, a ostateczną zawiesinę pozbawioną bakterii dawano na czysty agar albo z dodatkiem 0,5% NaCl, albo nawet wprost na wilgotne szkiełko. Na tych podłożach myksameby, zwykle po kilkogodzinnym okresie spokoju, poczynają się skupiać, tworzą normalne pseudoplazmodia, a następnie sorokarpy. Metoda ta ogólnie stosowana dostarczyła pewnych danych ilościowych i pozwoliła na dokładniejsze obserwacje przebiegu rozwoju.

Co do sposobu, w jaki rozpoczyna się skupianie, poglądy nie są zgodne. Jedni badacze (Arndt 1937, Raper 1940) podają, że myksameby zaczynają się skupiać wokoło drobnej grupy myksameb, gdy inni (Sussman, Noël 1952, Sussman 1952, Ennis, Sussman 1958) przyjmują, że jedna większa myksameba stanowi centrum, do którego podążają początkowo pojedyncze myksameby z najbliższego otoczenia, a następnie mniej lub bardziej ściśle uformowane strumienie. W strumieniach myksameby ułożone są w jednej warstwie, początkowo dosyć luźno, w miarę zbliżania się do centrum coraz bardziej ściśle, przy czym wydłużają się bardzo wydatnie. W centrum myksameby wpełzają jedne na drugie, stając się prawie izodiametryczne, tworząc pewne wzniesienie. Obszerne studia nad procesem agregacji *D. mucoroides* (Arndt.), i paru innych gatunków rodzaju *Dictyostelium* i *Polysphondylium violaceum,* Shaffera (1957c, 1958) wykazały, że w przebiegu skupiania się różnych gatunków (rys. 3, 9, 11), a nawet jednego gatunku, mogą zachodzić widoczne różnice. Nie zawsze jednakowo sprawnie formują się strumienie, często są różnej szerokości, albo oprócz głównego centrum powstają mniejsze skupienia, przekształcające się po pewnym czasie w strumienie zdążające do największego skupienia na danym obszarze (*D. mucoroides*). Wygląd formującego się pseudoplazmodium może być różny zależnie od warunków panujących w kulturze. Zwykle pierwsze albo jedyne skupienie myksameb posiada kształt promienisty, symetryczny; gdy tworzy się ich jednocześnie więcej, często są asymetryczne, ilość strumieni ogranicza się czasem zaledwie do dwóch. Gdy rozwój myksameb był bardzo silny, zagęszczenie ich duże, powstawały skupienia bez strumieni (Raper 1940b).

Kształt uformowanego pseudoplazmodium bywa różny. Najściślej jest on określony u *D. discoideum* — krótki wałek, i u *D. polycephalum* — wałek silnie wydłużony. Pseudoplazmodium gatunków *Polysphon-*

dylium posiada kontury zaokrąglone, a w centrum jego znajduje się wzniesienie, w którym rozpoczęła się już budowa sorokarpu. *D. mucoroides* rozpoczyna budowę sorokarpu, zanim wszystkie strumienie dotrą do centrum.



Rys. 3. Formujące się pseudoplazmodia: I *Dictyostelium discoideum*, II *Dictyostelium mucoroides*, III *Dictyostelium minutum*, IV *Polysphondylium violaceum* (wg Rapera, I, II, IV — *Quart. Rev. Biol.*, **26**, 1951, III — *Mycologia*, **33**, 1941) × 20.

Pseudoplazmodium stanowi pewną zwartą całość, co jednak nie przeszkadza zachowaniu przez poszczególne myksameby swojej samodzielności. Dowodem, że myksameby nie zlewają się z sobą, jak ma to miejsce w grupie *Myxomycetes*, jest możliwość uwolnienia ich przez rozbicie igiełką albo roztarcie pseudoplazmodium przez ucisk szkiełka (Raper 1940b), a także rozpędzenie myksameb za pomocą światła lampy mikroskopowej. Po takich zabiegach, o ile nie dostarczono odpowiedniego zapasu bakterii, myksameby po kilku godzinach spoczynku rozpoczynają budowę nowego pseudoplazmodium.

Skupianie się myksameb rozpoczyna się zwykle wtedy, gdy zmniejsza się wydatnie ilość bakterii. Obserwacja ta nasunęła przypuszczenie, że głód jest głównym czynnikiem wywołującym to zjawisko. Jednakże

już Potts (1902) i Olive (1902) wyrazili powątpiewanie, czy jest to czynnik wystarczający i mniemali, że obok niego działa jakiś czynnik chemiczny. W myśl tego przypuszczenia Olive przeprowadził doświadczenia na wzór doświadczeń Pfeffera ze spermatozoidami, stosując cukier i kwas jabłkowy.

Pewne światło na proces skupiania się myksameb rzuciły dopiero doświadczenia Runyona (1942), wskazując zarazem kierunek dalszych badań. Umieszczał on myksameby na celofanie; gdy już poczęły się skupiać, po drugiej stronie jego umieszczał nową ich ilość. Nowo nałożone myksameby skupiały się, odtwarzając dokładnie strumienie i skupienia znajdujące się po stronie przeciwnej. Takie zachowanie myksameb wskazywało na wpływ jakiegoś czynnika przenikającego przez celofan, a pochodzącego od tworzącego się pseudoplazmodium. Określeniem tego czynnika zajmował się Bonner (1947), przeprowadzając próby gromadzenia się myksameb w polu elektrycznym i magnetycznym, które zawiodły. Tak samo nie dało dodatniego wyniku wywoływanie skupienia się myksameb przez cienkie płytki szkła, miki i kwarcu zamiast celofanu, a więc nie było wpływu promieniowania.

Pozytywny rezultat dały doświadczenia, w których pośrednikiem między tworzącym się skupieniem a rozproszonymi myksamebami była woda. Wpływ skupienia przenosił się przez wodę. Np. po górnej stronie szkiełka dawano skupiające się myksameby, po dolnej rozproszone, i nieco pochyło umieszczano je w wodzie — myksameby z dolnej strony przechodziły na górną, kierując się ku skupieniu. Inne doświadczenie: na płytce agarowej wśród rozproszonych myksameb umieszczano tworzące się skupienie, na pochyłą płytkę puszczano strumień wody. Myksameby znajdujące się powyżej skupienia pozostały w rozproszeniu, gdy poniżej niego skupiały się, tworzyły strumienie poruszające się pod prąd w kierunku skupienia. Skupienie myksameb zabite nie wywierało żadnego wpływu na myksameby. Powyższe doświadczenia i im podobne dowodziły, że czynnikiem wywołującym skupianie się myksameb jest jakiś związek chemiczny przez nie produkowany. Bonner nazwał go akrazyną.

Myksameby produkują akrazynę nie tylko w okresie skupiania się, ale i w późniejszych okresach życia (Bonner 1949). Doświadczenia z nienaruszonym uformowanym już pseudoplazmodium *D. discoideum*, umieszczonym pośród rozproszonych myksameb, wykazały, że przednia jego część była dla nich najbardziej atrakcyjna, skupiały się tam najliczniej. To samo powtarza się przy dalszej budowie sorokarpu. Wierzchołkowa jego część, w której znajdują się komórki przeznaczone na budowę trzonka, jest najczynniejsza; produkują one akrazynę aż do zakończenia procesu różnicowania. Masa myksameb, przeznaczona na

mikrocysty, tylko bardzo słabo działa przyciągająco na myksameby, a gotowe mikrocysty zupełnie nie wydzielają akrazyny.

Bliższych danych o akrazynie dostarczyły badania Shaffera (1953, 1956a). Otrzymanie akrazyny w stanie czystym nastręczało duże trudności, gdyż roztwór wodny otrzymany przez zalewanie skupiających się myksameb był bardzo nietrwały; po kilku minutach w temperaturze pokojowej tracił zdolność wywoływania skupień. Zachowywał ją przez dłuższy czas w niskiej temperaturze, ale przy powrocie do temperatury pokojowej tracił ją. Bardziej stały czynny roztwór otrzymano, zalewając na kilku minut kulturę, w której rozpoczęła się agregacja, zimnym metanolem, który po odlaniu odparowywano. Otrzymany osad traktowano ponownie metanolem, odparowywano w próżni w temperaturze —10°. Proszek rozpuszczał się w wodzie bez reszty, dając roztwór o *pH* = 5, działający bardzo energicznie. Kropla dana między myksameby wywoływała ruch prowadzący do tworzenia się skupienia. Roztwór ten był trwały, nie tracił swych właściwości nie tylko w temperaturze pokojowej, ale nawet po godzinnym gotowaniu, a także był odporny na działanie 0,1 N roztworów HCl i NaOH. Ulegał jakiejś zmianie, stawał się nieczynny pod wpływem wodnego wyciągu z płytki agarowej pozbawionej myksameb. Ten sam wyciąg zagotowany nie wywiera szkodliwego wpływu na akrazynę. Czynna okazała się w tym wyciągu frakcja strącająca się półnasyconym roztworem siarczanu amonowego. Takie zachowanie się wyciągu wodnego pozwala na przypuszczenie, że czynnikiem obezwładniającym akrazynę jest enzym.

Z tych doświadczeń wynikało, że wyciąg wodny otrzymany bezpośrednio z kultury składa się z dwu związków: drobnodrobinowego, dyfundującego przez celofan i nie ulegającego zmianie przy ogrzewaniu, i związku o drobinach większych tracącego zdolność działania pod wpływem ogrzania do 100°.

Inną metodę otrzymywania akrazyny zastosowali Sussman, Lee, i Kerr (1956). Skupienia myksameb zalewali rozcieńczonym kwasem solnym o *pH* = 3,5. Płyn zlany z kultury, po oczyszczeniu przez dekantację i wirowanie, wykazywał fluorescencję w ultrafioletowym świetle, a po zobojętnieniu wywoływał skupianie się myksameb i był trwały. Po odparowaniu i wysuszeniu przedstawiał się jako żółty proszek rozpuszczalny w wodzie. Z 16 kultur zawierających około 10^9 myksameb otrzymano 150 mg proszku. Rozpuszczono 6 mg w 80% etanolu i za pomocą bibułowej chromatografii wykazano, że roztwór ten składa się z dwu związków *A* i *B*. Dla stwierdzenia, na który z tych związków działa domniemany enzym, ekstrahowano 8 kultur lodowatą wodą, po zlaniu jej i odparowaniu otrzymano 3 mg proszku, który rozpuszczono w jednym l wody. Po dodaniu tego roztworu do roztworu akrazyny

stwierdzono za pomocą chromatografii, że uległa zniszczeniu frakcja *A*, pozostała nienaruszona frakcja *B*. Dalsze badania wykazały, że w ekstrakcie akrazyny znajduje się bardzo czynny trzeci składnik *C* (Sussman 1958).

Jak wynika z przytoczonych badań, substancja wywołująca ruch myksameb i nim kierująca występuje obok czynnika działającego na nią obezwładniająco i, jak wykazały doświadczenia Shaffera (1956b), czyni to bardzo szybko. Mały blok agaru o 2-3 mm^2 powierzchni, na którym znajdują się myksameby poruszające się bezładnie, przykrywał szkiełkiem w taki sposób, aby można było, dając kroplę płynu, wywołać powstanie menisku. Jednocześnie w przygotowanych uprzednio kulturach *D. discoideum* dawał kroplę wody w bezpośrednim pobliżu tworzącego się skupienia. Po 5 minutach z tych kropli pobierano mikropipetą wodę zawierającą już akrazynę i przenoszono ją pod brzeg szkiełka przykrywającego bloczek. Jeżeli ten zabieg powtarzać wielokrotnie, co kilka sekund, to po kilku minutach myksameby zaczynają się poruszać w kierunku krawędzi szkiełka i ustawiać do niego prostopadle. O powodzeniu doświadczenia decyduje pośpiech. Przetrzymywanie wody obok gromadzących się myksameb albo opóźnienie przeniesienia jej pod szkiełko na bloczku grozi obezwładnieniem akrazyny. Tego rodzaju doświadczenia i inne przeprowadzone przez Shaffera (1956, 1957a, 1957b, 1958) pozwoliły bliżej poznać działanie akrazyny i reakcję na nie myksameb. Wrażliwość myksameb na obecność akrazyny nie jest jednakowa. Młode myksameby nie wydzielają akrazyny, nie reagują na jej obecność i jej nie wytwarzają. Stają się na nią wrażliwe dopiero w warunkach sprzyjających agregacji. Wtedy obecność akrazyny decyduje o kierunku ich ruchu i pobudza je do jej wytwarzania, zmienia właściwości ich powierzchni, zwiększając jej lepkość, co powoduje, że przy zetknięciu się silnie do siebie przylegają. Jedna myksameba czy cała ich grupa, która szybciej niż inne osiągnęła zdolność produkcji akrazyny, działa na najbliższe myksameby, pobudzając je jednocześnie do ruchu w określonym kierunku i do wydzielania akrazyny, pod wpływem której coraz dalsze komórki podejmują ruch. W ten sposób impuls nadany przez pierwsze komórki przenosi się coraz dalej, a wzmożona lepkość ich powierzchni ułatwia skupianie się ich w zwarte strumienie. Pojedyncze myksameby często nie skierowują się bezpośrednio w kierunku centrum; silniej działają na nie bliżej leżące strumienie, zdążają więc w ich stronę a następnie zostają przez nie zagarnięte i przez nacisk otaczających komórek zmuszone do ruchu w kierunku ruchu strumienia.

Trwałość ruchu myksameb i ich strumieni mogłaby być wynikiem różnicy koncentracji akrazyny w podłożu, ale wtedy trzeba by przyjąć

wielką na nią wrażliwość myksameb, odczuwających ją na przestrzeni kilkunastu mikronów. Akrazyna nie gromadzi się, w podłożu nie istnieje różnica jej koncentracji, nie dopuszcza do tego obecność przypuszczalnego enzymu, który ją obezwładnia. Znikanie akrazyny, jak tego dowiodły doświadczenia, odbywa się bardzo szybko i równie szybko pojawia się ona ponownie. Stąd hipoteza Shaffera, że każde wydzielenie pewnej ilości akrazyny stanowi bodziec szybko zanikający, wprowadzający w ruch myksameby. Im szybszy jest rytm zmian, tym jednostajniejszy jest ruch strumieni. Pewnym dowodem rytmicznych zmian ruchu myksameb w strumieniach są obserwowane przez różnych badaczy (Arndt, Raper, Bonner) występujące jak gdyby falowanie ich powierzchni.

Akrazyna pochodząca od różnych rodzajów rodziny *Dictyosteliaceae* nie jest jednakowa (Shaffer 1953). Roztwór akrazyny pochodzący z bardzo młodego skupienia *Polysphondylium violaceum* albo *Dictyostelium discoideum* działał tylko na myksameby danego gatunku, co pozostaje w zgodzie z tym, że gatunki te wysiane obok siebie dają osobne pseudoplazmodia. Inaczej zachowuje się akrazyna pochodząca ze starszych pseudoplazmodiów *Polysphondylium,* działa ona również na myksameby *Dictyostelium,* a więc w pewnym wieku *Polysphondylium* produkuje akrazynę dwojakiego rodzaju. Nie stwierdzono tego w kulturach *Dictyostelium.* Pochodząca z nich akrazyna nie działa na myksameby *Polysphondylium,* albo działa tylko na niektóre bardziej wrażliwe.

Podobnie jak akrazyna działa na myksameby (Wright, Anderson 1958) mocz kobiety ciężarnej, co spowodowało badania wpływu związków należących do grupy steroidów. Stwierdzono, że znajdują się między nimi związki aktywne, jednakże z powodu bardzo słabej ich rozpuszczalności nie zdołano bliżej określić ich działania. Wyjątek stanowił siarczan estronu, działający już w ilości $<0{,}05$ γ/ml, jednakże nie tak silnie jak akrazyna.

Stwierdzenie wydzielania przez myksameby akrazyny i jej wpływu na ich skupianie się nie rozwiązywało innych jeszcze zagadnień, nasuwających się przy obserwacji tworzących się pseudoplazmodiów. Pierwszym z nich było pytanie, co decyduje o ilości powstających w kulturze skupień. Do wniosku, że ilość pseudoplazmodiów zależna jest nie tylko od ilości myksameb w populacji, ale także od ich rozłożenia na powierzchni podłoża, czyli do ich zagęszczenia, doszedł Sussman (1952, 1956b). Z licznych obserwacji przeprowadzonych nad myksamebami *D. discoideum,* płukanymi, dokładnie liczonymi, a następnie skupiającymi się na powierzchni głodowego agaru lub wilgotnego szkiełka, wynikało, że zbyt małe zagęszczenie myksameb przeszkadza ich skupianiu się; np. myksameby w ilości poniżej 80 na 1 mm^2

nie tworzą skupienia. Ta sama ilość myksameb rozłożona na mniejszej powierzchni stworzy skupienie. Najkorzystniejszym dla powstania licznych pseudoplazmodiów *D. discoideum* jest zagęszczenie 200 myksameb na 1 mm², a dla *D. purpureum* — 100. Dalsze liczne doświadczenia, głównie z mutacjami, pozwoliły stwierdzić, że każdy gatunek posiada odmienne optymalne zagęszczenie, od którego odchylenie w obie strony powoduje zmniejszenie ilości pseudoplazmodiów. (Dla przeciwdziałania zakażeniu bakteriami w ciągu tych doświadczeń stosowano czasem siarczan streptomycyny, działający hamująco na rozwój myksameb ale nie wpływający ujemnie na agregację i budowę sorokarpu).

Obserwacje mikroskopowe bardzo drobnych ilości skupiających się myksameb pozwoliły stwierdzić (Sussman 1952, 1956, Sussman, Noël 1952), że centrum tworzy jedna komórka inicjalna, a z licznych żmudnych doświadczeń ze ściśle liczonymi myksamebami wynikało, że w populacji *D. discoideum* inicjalna myksameba przypada na 2100--2200 zwykłych, a w populacji *D. purpureum* jedna na 300.

Dalsze badania (Ennis, Sussman 1958, Sussman 1958) wykazały, że w populacji *D. discoideum* można wyróżnić pewną ilość myksameb, różniących się od większości rozmiarami i wyglądem. Są one 3-10 razy większe od innych, silnie rozpłaszczone, treść ich jest bardziej ziarnista, jądro odpowiednio większe, tworzą liczne pseudopodia i poruszają się szybciej. Ilość odmiennych myksameb w stosunku do zwykłych jest nieznaczna: jedna na około 2000, czyli mniej więcej taki sam stosunek, jaki otrzymano na podstawie obliczeń dla myksameb uznanych za inicjalne. Liczne obserwacje wykazały pewną korelację między miejscem występowania większej myksameby a powstawaniem skupienia. Pozbawienie młodej populacji większych myksameb za pomocą mikromanipulatora hamuje powstawanie skupień, odwrotnie — przeniesienie jej między rozproszone myksameby wywołuje ich gromadzenie się wokoło niej albo w jej pobliżu.

Nasuwało się przypuszczenie, że obserwowane większe myksameby są identyczne z większymi myksamebami obserwowanymi przez Skupieńskiego (1920) i Wilsona (1953) i traktowanymi przez nich jako zygoty. Sussman jednakże odrzuca to przypuszczenie, gdyż w czasie rozwoju bardzo małych populacji mutanta *D. discoideum* (*Fty-1*) nie stwierdzono zmniejszenia się ilości myksameb, które musiałoby nastąpić w razie syngamii, a także w preparatach barwionych hematoksyliną i acetoorceiną nie spotkano jąder aktywnych. Wobec tego Sussman przyjmuje, że myksameby inicjalne są stałym składnikiem populacji, biorą udział w rozwoju, lecz różnią się genetycznie od reszty myksameb.

Przyjęcie przez Sussmana i Ennisa istnienia myksameb inicjalnych

różnych genetycznie pozostaje w sprzeczności z wynikami wcześniejszych prac Sussmana i współpracowników, z których wynikało, że ilość skupień wzrasta bardzo wydatnie w kulturach mieszanych *D. discoideum* z jego mutantami.

Mutanty otrzymano (R. Sussman i M. Sussman 1953) przez naświetlanie zawiesiny o znanej ilości mikrocyst albo myksameb światłem ultrafioletowym lampy „A. Germicidal" w ciągu 90 sekund z odległości 10,5 cm. Przy tym zabiegu tylko około 1% komórek pozostaje przy życiu i jest zdolny do rozmnażania.

Głównym materiałem otrzymywania mutantów było *D. discoideum* i one budziły największe zainteresowanie. Mutanty *D. mucoroides* i *D. purpureum*, wykazujące podobne odchylenia od tych jak *D. discoideum*, nie były przedmiotem dalszych badań.

Mutanty *D. discoideum* były bardzo liczne. Ze względu na cechy różniące je od typu można było wyróżnić 6 grup. Najliczniejsza była grupa szczepów, które utraciły zdolność skupiania się; ich kultury składały się z myksameb rozproszonych na powierzchni agaru. Mniej liczne były szczepy tworzące skupienia lecz niezdolne do budowy sorokarpów. Najmniej było takich, których rozwój kończył się budową sorokarpów, mniej lub bardziej odbiegających od typowych. Między tymi ostatnimi wyróżniono 4 formy: 1) krzaczasty (bushy) posiadający pseudoplazmodium nieruchome, z którego powstaje kilka drobnych czasem niezupełnie normalnych sorokarpów, 2) widlasty (forket) — trzonek gruby nosi na sobie dwa sorusy, 3) karłowaty (dwarf) — sorokarpy złożone z bardzo małej ilości komórek (12-56), komórki trzonka wydłużone, 5) szklisty (glassy) — sorokarpy bez wyraźnego podziału na sorus i gruby trzonek, nadający całości dużą sztywność.

Niektóre mutanty po przeszczepianiu powracały do formy typowej, zwanej „dziką", inne utrzymywały się w kulturach przez szereg pokoleń bez zmiany.

Obok hodowli, dla zbadania trwałości cech mutantów stosowano metodę przenoszenia płukanych myksameb na agar głodowy (Sussman 1954). Niektóre szczepy mutantów, nie tworzące skupień w kulturze, przeniesione na agar skupiały się, a nawet niektóre tworzyły sorokarpy. Gdy jednak zostały ponownie wysiane z bakteriami na pożywkę, rozwijały się lecz nie skupiały. Inne, nie skupiające się na pożywce, na agarze skupiały się, lecz nie tworzyły sorokarpów. Inna jeszcze grupa zachowywała się jednakowo na obu podłożach — nie tworzyła skupień. Wyniki tego rodzaju doświadczeń nasuwają przypuszczenie, że rozwój niektórych mutantów był hamowany albo przez obecność jakiegoś składnika pożywki, albo przez produkty przemiany

materii bakterii, a stąd wniosek, że naświetlenie spowodowało jakieś zmiany w działaniu lub składzie enzymów.

Mutanty tworzące skupienia i sorokarpy, różniły się od formy dzikiej ilością myksameb potrzebnych do wywołania skupienia. Np. w kulturach mutanta oznaczonego symbolem *Ft-1* przy optymalnym zagęszczeniu jedno skupienie przypadało na 24 myksameby, w kulturze *Dw-1* na 40, a w kulturze mutanta krzaczastego — na 1800.

Z doświadczeń z mieszaniną myksameb formy typowej z myksamebami jej mutantów wynikało, że myksameby obu form wywierają na siebie wpływ decydujący o ilości powstających skupień. Gdy do określonej ilości myksameb formy dzikiej dodano stosunkowo niewiele myksameb mutanta niezdolnego do skupiania się, to ilość skupień była większa niż wypadało to z ilości komórek inicjalnych, które według rachunku miały się znajdować między myksamebami formy dzikiej. Oznacza to, że w obecności myksameb mutanta wystarcza mniejsza ilość myksameb do stworzenia pseudoplazmodium. Myksameby różnych mutantów nie w jednakowym stopniu obniżają ilość myksameb przypadających na jedno skupienie, np. z jednym mutantem na jedno skupienie przypadało 980 myksameb formy dzikiej, z innym 1780, a jeszcze z innymi ich ilość malała do stu kilkudziesięciu. Niekiedy dodatek myksameb mutantów umożliwiał powstanie skupień nawet wtedy gdy ilość myksameb typu dzikiego była niewystarczająca, a ich zagęszczenie zbyt małe, np. 50 na 1 mm^2. Fakty te nasuwały przypuszczenie, że myksameby mutanta biorą udział w tworzeniu pseudoplazmodium.

W doświadczeniach z mieszaninami, w których stosunek ilości myksameb typu dzikiego do myksameb mutanta, nie zdolnego do tworzenia skupień, wynosił 1 : 50, 1 : 83, 1 : 139, 1 : 234, powstały sorokarpy (Sussman 1952), których mikrocysty wysiane z bakteriami dały wszystkie normalne sorokarpy. Wynikało z tego, że albo myksameby mutantów nie wchodzą w skład pseudoplazmodiów formowanych przez myksameby typu dzikiego, albo myksameby mutanta nie przekształcają się w mikrocysty, albo, wchodząc w skład skupienia, powracają do typu.

Udział myksameb mutanta w skupieniach można stwierdzić w dwojaki sposób (Ennis, Sussman 1958a): barwiąc przyżyciowo jego myksameby albo stosując mutanty posiadające zdolność budowy sorokarpu. Obecność komórek barwionych można było stwierdzić we wszystkich częściach sorokarpu. Z mieszaniny z mutantem *Agg-91*, dającym sorokarpy karłowate, wobec niewielkiej ilości myksameb typu dzikiego powstały sorokarpy o dwojakich mikrocystach — normalnych i znacznie mniejszych, które nie przerastały. Można więc przyjąć, że myksa-

meby mutantów zmieszane z myksamebami typu dzikiego pełnią podwójną rolę: biorą udział w skupieniach i pobudzają myksameby mniej aktywne do ich tworzenia.

Nie wszystkie jednak mutanty w mieszaninie z dzikim typem powodowały zwiększenie ilości skupień; niektóre obniżały ją, a trzy z nich, *Agg-59*, *Agg-71* i *Agg-72*, hamowały ich powstawanie nawet wtedy, gdy ilość myksameb typu dzikiego była dostateczna (20 000) i ich zagęszczenie odpowiednie. Tego rodzaju antagonistyczne działanie po raz pierwszy było obserwowane przez Pfützner-Eckert (1950) w kulturach mieszanych *D. mucoroides* ze szczepem nie posiadającym zdolności skupiania się.

Obecność myksameb typu dzikiego na myksameby mutantów działa w kierunku odwrotnym. Ilość myksameb mutanta potrzebnych do stworzenia skupienia wzrasta, np. u myksameb *Fty-1*, w obecności myksameb typu dzikiego bez względu na ilość tych ostatnich, wzrosła z 24 do 58-62 (Sussman 1955). Mutanty również wywierają na siebie wzajemnie wpływ i to przeważnie dodatni (Sussman 1954), np. mutant tworzący luźne skupienia, lecz nie budujący sorokarpu, w mieszaninie z myksamebami mutanta niezdolnymi do skupiania się wytworzył sorokarpy. W jednym tylko wypadku stwierdzono antagonistyczne działanie na siebie dwu mutantów: *Agg-206* i *Agg-208*. Mutant *Agg-208* nie tworzy skupień na pożywce, daje je jednak na czystym agarze. Obecność myksameb mutanta *Agg-206* hamuje powstawanie skupień, co więcej, taki sam wpływ wywierają jego komórki zabite.

Najprostszym nasuwającym się wyjaśnieniem mechanizmu wzajemnego oddziaływania myksameb na siebie było przyjęcie wydzielania przez nie jakiejś substancji. Dla sprawdzenia tego przypuszczenia przeprowadzono szereg doświadczeń (Sussman, Lee 1955, Ennis, Sussman 1958, Sussman 1958) polegających na przenoszeniu dwu różnych szczepów na odwrotne strony bardzo delikatnej błonki agarowej, otrzymanej przez zanurzenie jednym końcem rurki (2 cm średnicy, 5 mm wysokiej) do agaru o temperaturze 50-60°. Po górnej stronie błonki, 30-60 μ grubej, umieszczano myksameby mutanta, po dolnej — typu dzikiego. W tych warunkach myksameby mutantów zachowywały się rozmaicie, jedne mniej lub bardziej dokładnie powtarzały obraz strumieni powstających po stronie dolnej, inne w ogóle nie reagowały na to, co się działo po stronie przeciwnej.

Ujawnienie się wpływu mutantów na ilość skupień tworzonych przez myksameby typu dzikiego zależy od stosunku ilości myksameb znajdujących się po obu stronach błonki. Przy małej ilości myksameb typu dzikiego (2000) i zagęszczeniu 67 na 1 mm^2 obecność mutanta nie miała wpływu, skupienie nie powstawało. Przy dostatecznej ilości,

20 000 myksameb typu dzikiego, a po odwrotnej stronie błonki 3×10^5 myksameb mutanta, ilość skupień była większa niż w kulturze kontrolnej, zależnie od mutanta od 1,7 do 9,5 raza.

Wobec stwierdzenia wydzielania przez myksameby substancji dyfundującej przez błonę, przeprowadzono doświadczenia z wyciągami myksameb rozcieranych z suchym lodem, a po odwirowaniu dodawano je do agaru. Wyciągi z bardzo młodych myksameb nie wywierały żadnego wpływu, dopiero pochodzące z kultur starszych były czynne. Aktywność wyciągów była różna. Wyciąg mutanta *Agg-70* powodował przy 20 tysiącach myksameb typu dzikiego 2,6 raza więcej skupień niż było ich w kontroli: wyciąg mutanta *Agg-72* — 2,5 raza więcej, a *Fty-1* aż 11,4 raza. Bardzo wyraźny był wpływ wyciągu z myksameb typu dzikiego — wywołał 7,8 raza więcej skupień.

Na podstawie doświadczeń, przeprowadzonych przez Sussmana i jego współpracowników, wydaje się, że w populacji myksameb nie ma miejsca na komórki inicjalne różniące się genetycznie od reszty. Może dalsze prace przyniosą wyjaśnienie sprzeczności wynikających z badań tych samych badaczy.

Wpływ czynników zewnętrznych na okres agregacji jest bardzo ograniczony. Podniesienie temperatury o parę stopni przyśpiesza skupianie się myksameb o kilka godzin, obniżenie — opóźnia. Zmniejszenie wilgotności podłoża, a także otaczającej atmosfery, przyspiesza, zwiększenie opóźnia skupianie się myksameb. Przyspieszająco działa światło na kulturę hodowaną w ciemności, a następnie wystawioną na działanie światła rozproszonego. Na te czynniki reaguje jednakowo większość gatunków badanych.

Brak tlenu hamuje skupianie się myksameb, ale nawet 48-godzinny ich pobyt w atmosferze pozbawionej tlenu nie wpływa szkodliwie: przeniesione do normalnej atmosfery podejmują na nowo przerwane tworzenie pseudoplazmodium (Raper 1940b). W atmosferze zawierającej 5% tlenu myksameby *D. discoideum* skupiały się, ale nie tworzyły pseudoplazmodium, przy 10% tlenu rozwój kończył się na pseudoplazmodium, które przeniesione w normalne warunki budowało sorokarp. Dalsze zwiększenie ilości tlenu poza normalną jego zawartością, jak i czysty tlen, nie wywierało wyraźnego wpływu (Takeuchi, Tazawa 1955).

Zagadnieniem wpływu różnych związków chemicznych na skupianie się myksameb zajmował się szereg badaczy (Hirschberg, Rusch 1950, 1951; Takeuchi, Tazawa 1955; Bradley, Sussman, Ennis 1956; Wright, Anderson 1958). Miarą wpływu poszczególnych związków, o ile nie powodowały uszkodzenia myksameb, był stosunek między ilością powstających skupień a ilością myksameb i ich

zagęszczeniem. Badania prowadzone były na agarze głodowym, do którego dodawano różne ilości badanego związku, albo przez przetrzymywanie przez krótki okres czasu myksameb w badanym roztworze. Na obecność bardzo wielu związków myksameby nie reagują, skupianie odbywa się normalnie. Należą do nich liczne aminokwasy, witaminy i antybiotyki. Obserwowana obojętność na obecność różnych związków pochodzi przypuszczalnie stąd, że myksameby ich nie pobierają, gdyż trudno przyjąć, aby pochłonięte nie wywierały wpływu na procesy życiowe. Niektóre związki, jak cysteina, kwas cytrynowy, glicerol, kwas jodooctowy, kwas indolooctowy, dwukumarol i sole kwasu malonowego, działają hamująco na skupianie się myksameb, ale nie powodują ich uszkodzenia. Hamowanie przez dwukumarol i sole kwasu malonowego tworzenia skupień wskazuje na znaczenie enzymów czynnych w cyklu Krebsa i w oksydatywnej fosforylizacji. Kwasy: mlekowy, i mrówkowy, seryna, hydrolizat kazeiny, DNA, RNA hamują rozwój.

Odmiennie od inych związków zachowuje się histydyna i adenina. Dodatek 0,01 M histydyny pozwala na agregację poniżej wymaganego zagęszczenia i przyśpiesza ją w stosunku do szybkości skupiania się myksameb na agarze głodowym. Działanie histydyny jest trwałe i nieodwracalne. Adenina nie hamuje skupiania się myksameb, podnosi tylko wymagania co do większego zagęszczania populacji; działanie jej jest odwracalne — przemycie użytego materiału powraca go do stanu pierwotnego.

Niekiedy działanie różnych związków zależne jest od koncentracji i wartości *pH*; np. KCN w koncentracjach 10^{-3} i 10^{-4} M przy *pH* = 5 hamuje tworzenie pseudoplazmodium *D. discoideum*, w koncentracji 10^{-5} działa pobudzająco, a wobec *pH* = 7 już przy koncentracji 10^{-4} rozwój jest normalny. NaN_3 w koncentracji 10^{-4} M. przy *pH* = 6,2 hamuje powstawanie pseudoplazmodium, w koncentracji 10^{-5} działa pobudzająco; 2-4-dwunitrofenol działa hamująco nawet w koncentracji 10^{-5} M. Zahamowanie jest odwracalne, po usunięciu hamującego związku myksameby mogą tworzyć pseudoplazmodium. W czasie działania 2-4-dwunitrofenolu wzrasta w myksamebach koncentracja fosforanów, a jednocześnie ulega zmniejszeniu fosfor kwasu ribonukleinowego. Kwas jodooctowy w koncentracji 10^{-2} M przy *pH* = 5 hamował całkowicie tworzenie się pseudoplazmodium, ale już przy koncentracji 10^{-3} rozwój był normalny tylko nieco opóźniony.

Związki mineralne. $FeSO_4$ i KJ działają zabójczo, inne jak KCl i $CaCl_2$ nie hamują skupiania się myksameb; występuje tylko różnica w ilości powstałych pseudoplazmodiów. W obecności KCl powstaje więcej skupień drobnych, gdy dodatek $CaCl_2$ powoduje zwolnienie procesu skupiania się, skupień powstaje mniej, ale są większe. Obecność

kationow Ca i K wpływa na zwiększenie lepkości myksameb. Pozostaje jeszcze do rozpatrzenia sprawa dotychczas sporna, czy myksameby tworzące pseudoplazmodium są haploidalne, czy diploidalne, a zatem czy przed okresem agregacji, czy podczas niego odbywa się kopulacja myksameb. Tym zagadnieniem interesował się już Brefeld. Obserwacje jego dały wynik negatywny, nie stwierdził bowiem łączenia się myksameb, tak samo jak i inni badacze, zajmujący się rozwojem najpospolitszych gatunków *D. mucoroides* i *P. violaceum*. Dopiero Skupieński (1918, 1920), podając swoje obserwacje nad *D. mucoroides*, opisał kopulację jego myksameb. Wobec tego jednak, że jednocześnie twierdził on, że zygoty tworzą właściwe plazmodium, obserwacje jego przez długie lata pozostawały w zapomnieniu. Przypomniał o nich Wilson (1952, 1953), opisując kopulację *D. discoideum*. Opisy samego aktu kopulacji, zachowania się zygot, czas podziałów redukcyjnych u wymienionych badaczy są różne, należy więc wymienić wyniki badań każdego z nich osobno.

Według Skupieńskiego myksameby *D. mucoroides* wydostające się z mikrocyst są haploidalne; jądro ich zawiera 4 chromosomy; rozmnażają się przez podział mitotyczny. Po pewnym czasie stają się gametami, co jest poprzedzone pewnym przygotowaniem, polegającym na pozbyciu się z jądra części chromatyny. Jądro przybiera postać półksiężyca i od jego wklęsłej powierzchni odrywają się drobne cząstki, barwiące się tak jak chromatyna i z czasem zanikające w cytoplazmie. Skupieński wypowiada hipotezę, że jest to proces prowadzący do podziału płci. Łączenie się gamet rozpoczyna się przez pseudopodia i przebiega do zupełnego zlania się cytoplazmy i jąder. Powstałe zygoty różnią się od haploidalnych myksameb większymi rozmiarami, bardziej ziarnistą treścią, większymi jądrami i liczniejszymi wodniczkami. Skupiają się one w strumienie zdążające do określonego centrum. W tym okresie można je rozproszyć za pomocą światła albo mechanicznie. Gdy jednak dojdzie do tego, że skupienie zaokrągli się równomiernie, myksameb rozdzielić już nie można, gdyż są zlane w plazmodium. Na podstawie obserwacji bardzo drobnego pseudoplazmodium powstałego z 14 zygot, Skupieński stwierdza, że przy różnicowaniu się ich na komórki trzonka i mikrocysty ulegają one dwom podziałom, tak że każda zygota daje 4 komórki.

Zgodnie z obserwacjami Skupieńskiego Wilson (1952, 1953) stwierdził kopulację myksameb *D. discoideum*. Następnie badania zostały rozszerzone na inne gatunki: *D. purpureum*, *P. violaceum*, *P. pallidum* i niektóre mutanty Sussmana (Wilson, Ross 1957).

Kopulacja myksameb odbywa się szybko, co powoduje, że jest trudna do uchwycenia i obserwowano ją rzadko. Jedna myksameba otacza

drugą, wchłaniając ją stopniowo. Nie zawsze po syngamii następuje kariogamia. Czasem pochłonięta myksameba kurczy się i jako ciemna, gęsta masa zostaje wydalona; nie obserwowano jednak jej trawienia. Takie zachowanie się myksameb dało powód do wyrażenia przypuszczenia (Sussman 1955, Bonner 1959), że nie jest to proces kopulacji, lecz zjawisko kanibalizmu. Bonner obserwował czasem myksameby zawierające wewnątrz więcej niż jedną komórkę.

Według Wilsona, pierwsze powstałe zygoty stają się centrami, wokół których skupiają się inne, przy czym już w czasie agregacji rozpoczynają się podziały redukcyjne, które można jeszcze obserwować w pseudoplazmodium w pierwszym okresie jego wędrówki. W czasie budowy sorokarpu, gdy myksameby przekształcają się w mikrocysty, odbywają się dwa następne podziały, tak że ostatecznym wynikiem jest 16 mikrocyst pochodzących od jednej zygoty. Dowodem, że w tym ostatnim okresie odbywają się podziały, mają być czasem spotykane dwujądrowe mikrocysty, a także bardzo znaczne zmniejszenie się rozmiarów komórek.

W czasie podziałów myksameb haploidalnych stwierdzono obecność w jądrze u *D. discoideum* 7, *P. violaceum* 8 albo 9 chromosomów, a w jądrach zygot w czasie mejozy odpowiednio 14 i 16. Fakty, że proces kopulacji był rzadko obserwowany i dziwne niekiedy zachowanie się myksameb względem pochłoniętych towarzyszek, nasunęły przypuszczenie, że nie wszystkie myksameby stają się gametami zdolnymi do kopulacji, podobnie jak ma to miejsce u niektórych pierwotniaków i jednokomórkowych glonów.

Prawie jednocześnie z pierwszą pracą Wilsona pojawiła się praca Bonnera i Frascella (1952) potwierdzająca obserwacje, dotyczące występowania podziałów w czasie wędrówki pseudoplazmodium *D. discoideum*. Miały to być jednak podziały myksameb haploidalnych, posiadających w jądrach cztery chromosomy o 7 ramionach. Podziały odbywają się w świeżo powstałym pseudoplazmodium w obszarze przeznaczonym na komórki trzonka i są pierwszym sygnałem początku ich różnicowania się. Później dopiero rozpoczynają się podziały w masie myksameb, mających się przekształcić w mikrocysty.

Wyniki przytoczonych prac są zasadniczo różne. Nie można tego wyjaśnić stosowaniem odmiennych metod badania. Materiałem badań Wilsona były kultury, z których bezpośrednio przygotowywano preparaty barwione acetoorceiną i akryflawiną w 65% kwasie octowym. Bonner i Frascella śledzili rozwój myksameb po oczyszczeniu ich z bakterii, a pseudoplazmodia były utrwalane, cięte na części i barwione także orceiną.

Wyniki badań Wilsona poddał krytyce Bonner (1959), godząc się

tylko z tym, że w jądrach *D. discoideum* znajduje się 7 chromosomów, co stwierdził także cytowany przez niego Labudde (1956).

Przeciwko twierdzeniu, że w czasie tworzenia pseudoplazmodium odbywa się kopulacja myksameb, wypowiada się Shaffer (1958). Nie obserwował on jej ani przed łączeniem się myksameb w strumienie, ani w ich obrębie. Możliwość kilkakrotnego rozbijania strumieni i gotowego pseudoplazmodium i ponownego ich tworzenia się przemawia przeciwko temu, aby mogły odbywać się w tym czasie kopulacje albo podziały redukcyjne. Musiałoby to powodować zmianę rozmiarów komórek, czego nie obserwował.

Dotychczasowe badania nie rozstrzygnęły sprawy płciowości u *Dictyosteliaceae*, zagadnienie to czeka na dalsze poszukiwania. Przy okazji przeprowadzonych badań został jednak obalony ogólnie przyjęty pogląd o istnieniu ostrej granicy między okresem wegetatywnym a dalszymi etapami rozwoju, w ciągu których nie tylko odżywianie, ale także podziały komórek miały być wykluczone. Okazało się, że podziały komórek odbywają się w czasie wędrówki pseudoplazmodium, jak i w okresie kulminacji, co dowodzi, że podziały związane z różnicowaniem się myksameb mogą odbywać się bez pobierania pokarmu.

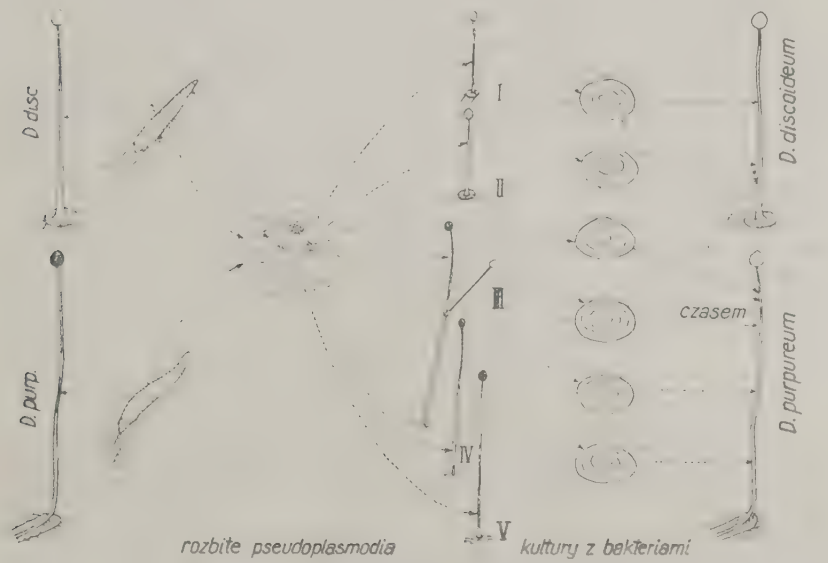
Przeciwko istnieniu procesu seksualnego u rodzajów rodziny *Dictyosteliaceae* w warunkach hodowli przemawiają negatywne wyniki prób otrzymania mieszańców. Raper i Thom (1941) przeprowadzili szereg hodowli, w których próbowali krzyżować gatunki rodzaju *Dictyostelium* między sobą, a także *D. discoideum* z *Polysphondylium violaceum*.

Jednoczesny rozwój na wspólnej pożywce przedstawicieli różnych rodzajów dał wynik wyraźny: każdy rodzaj wytworzył osobne pseudoplazmodia, z których powstały sorokarpy typowe dla każdego z nich.

Wspólne kultury *D. discoideum* i *D. purpureum* wyglądały inaczej; były tu wspólne pseudoplazmodia, z których powstawały obok siebie dwa sorokarpy: *D. discoideum* i *D. purpureum*. Podobny rezultat dała wspólna kultura *D. discoideum* i *D. mucoroides*. W tej kulturze użyto jako pożywienia zamiast *Escherichia coli* czerwono zabarwionej *Serratia marcescens* w celu zabarwienia myksameb *D. discoideum*, które nie trawią barwnika, lecz gromadzą go w wodniczkach, w przeciwieństwie do *D. mucoroides*, którego myksameby pozostają bezbarwne. Powstało wspólne pseudoplazmodium, a z niego dwa sorokarpy, czerwony *D. discoideum*, bezbarwny *D. mucoroides*.

Inny rezultat dały doświadczenia przeprowadzone w sposób odmienny. Hodowano oddzielnie *D. discoideum* i *D. purpureum* w warunkach optymalnych, a gdy rozpoczęło się tworzenie pseudoplazmodium rozbito je, a otrzymane z nich wolne myksameby zmieszano i umieszczono razem na płytce głodowego agaru (Rys. 4). Po pewnym czasie spokoju myksa-

meby skupiły się w pseudoplazmodia, które dały 5 rodzajów sorokarpów: dwa z nich *I* i *V* były typowymi: *D. discoideum* i *D. purpureum*. Jeden sorokarp, *III*, był typowym *D. purpureum*, lecz z bocznym odgałęzieniem zakończonym białym sorusem. Dwa pozostałe *II* i *IV* przypominały mieszańce: (II) *D. discoideum* z blado niebieskim sorusem i blado niebieski (*IV*) sorus osadzony na wiotkim, wątłym trzonku bez dyska. Ze wszystkich sorusów bladoniebieskich otrzymano kultury z pojedynczych mikrocyst; we wszystkich były sorokarpy typowe *D. discoideum* albo *D. purpureum*, a więc zabarwione sorusy były prostą mieszaniną mikrocyst obu gatunków.



Rys. 4. Rozwój mieszanych kultur *Dictyostelium discoideum* i *D. purpureum*. Objaśnienia w tekście (wg Raper and Thom, *Am. Jour. Bot.* 28: 75, 1941).

W podobny sposób przeprowadzone doświadczenia z *D. discoideum* i *P. violaceum* dały trzy formy sorokarpów: dwie typowe dla obu gatunków i jednego pozornego mieszańca o nierozgałęzionym trzonku zakończonym sorusem fioletowym. Wysiane z fioletowego sorusa pojedyncze mikrocysty dały tylko kultury z typowymi sorokarpami *D. discoideum* i *P. violaceum*.

Z szeregu doświadczeń wynikało, że nieco wyższa temperatura niż optymalna (26-28°) sprzyja powstawaniu pozornych mieszańców; ilość ich dochodziła do 50%.

Na takie zachowanie się mieszanin myksameb pochodzących z kultur, w których były one w stadium skupiania się, pewne światło rzucają doświadczenia Gregga (1956) z aglutynacją myksameb surowicą otrzymaną przez uodpornianie królików myksamebami z 48-godzinnych kultur *D. discoideum, D. purpureum* i *P. violaceum.* Otrzymane surowice powodowały aglutynację myksameb pochodzących z młodych kultur tylko odpowiednich gatunków. Inny był wynik, gdy poddano działaniu surowic myksameby starsze, z kultur, w których znajdowały się one w stadium skupiania się — wszystkie, bez względu na pochodzenie surowicy, ulegały aglutynacji. Surowica królika nieuodpornionego powoduje tylko bardzo słabą aglutynację młodych myksameb *D. purpureum* i *P. violaceum,* a wyraźną z kultur 72-godzinnych. Taki wynik doświadczeń dowodzi, że w czasie rozwoju myksameb zachodzą jakieś zmiany we właściwości ich powierzchni, pojawia się z wiekiem jakiś nowy antygen wspólny dla wszystkich gatunków, a nawet rodzajów. Myksameby pochodzące z roztartych pseudoplazmodiów w doświadczeniach Rapera i Thoma posiadały już wspólny antygen pozwalający na powstanie pseudoplazmodium, złożonego z dwu różnych gatunków. W kulturach pochodzących z mikrocyst młode myksameby posiadały tylko antygen swoisty. Nie dopuszczał on do ściślejszego łączenia się w jedno pseudoplazmodium w wypadku różnych rodzajów, a wspólnego sorokarpu dla różnych gatunków.

Dictyostelium discoideum Raper

1935. *J. Agricul. Res.* **50**: 135.

Szarobiały albo żółtawy sorus, 125-300 μ średnicy, złożony z mikrocyst eliptycznych, 6-9×2,5-3,5 μ, obejmuje wierzchołek trzonka 1-3 mm rzadko do 5 mm wysokiego, wyrastającego z płaskiego albo nieco stożkowatego dyska.

D. discoideum różni się od podobnych do niego gatunków tego samego rodzaju obecnością dyska i, wraz z *D. polycephalum,* pseudoplazmodium poruszającym się po podłożu, czyli przechodzeniem w czasie rozwoju stadium migracji.

Początkowo promieniste pseudoplazmodium przekształca się w utwór cylindryczny o przedniej części trochę zwężonej i wierzchołku nieco wzniesionym ku górze. Tylna część przeważnie tępo ścięta. Rozmiary pseudoplazmodium są różne, najczęściej, wynoszą 0,8-1,2×0,15-0,25 mm, wyjątkowo długość dochodzi do 2 mm. Rozmiary najmniejszych nie przekraczają 0,5×0,1 mm. Wielkość pseudoplazmodiów zależna jest od ilości skupionych w nich myksameb; w największych z nich znajdowano do 125 tysięcy, w najmniejszych około 10 tysięcy (Raper 1940b).

W pseudoplazmodium myksameby są mniej więcej zaokrąglone, luźniej ułożone niż w strumieniach, mogą się wewnątrz niego poruszać, nawet z różną szybkością. Między myksamebami nie ma żadnej substancji, stykają się one z sobą bezpośrednio (Gazelius, Ranby, 1957). Wydzielany przez myksameby śluz pokrywa całe pseudoplazmodium, tworząc błonkę, która w atmosferze wilgotnej jest miękka, nie stawia żadnego oporu igiełce, w wodzie rozpływa się, w stanie suchym staje się twarda, pod uciskiem igiełki ugina się i pęka, przy silniejszym wysuszeniu może powodować zniekształcenie pseudoplazmodium. Poruszające się pseudoplazmodium pozostawia błonkę poza sobą w postaci długiej rurki, którą wraz z nim można unieść z podłoża (Raper 1940b). Początkowo, na podstawie bardzo słabej reakcji na celulozę pomimo nierozpuszczalności błonki w odczynniku Schweitzera, przyjmowano, że w skład jej wchodzi celuloza obok mucyny (Raper, Fenell 1952). Mikroskop elektronowy nie wykazał w niej żadnej struktury, nie znaleziono fibrili charakteryzujących celulozę (Mühlethaler 1956).

Myksameby, poruszając się, pozostawiają także ślad i to tym wyraźniejszy, im bogatsze jest podłoże. Porównaniem śladów myksameb z błonką pseudoplazmodium zajął się Paddock (1953). Błonkowatą rurkę i ślady myksameb barwił 0,01% wodnym roztworem kongo, rozlewając go na kulturę agarową. Błonka barwiła się, ślady myksameb zanikały i pojawiały się ponownie, gdy roztwór został zabsorbowany przez agar. Ślady myksameb są prawdopodobnie zjawiskiem mechanicznym, spowodowanym nierównomiernym obsychaniem powierzchni agaru. W każdym razie obserwacje te wskazują, że mechanizm ruchu myksameb i pseudoplazmodium nie jest identyczny. Pseudoplazmodium porusza się wewnątrz rurki, jakby na taśmie, nie stykając się bezpośrednio z podłożem. Jednocześnie z odrzuconą pochewką zostaje usunięta różna ilość zwakuolizowanych myksameb.

Już w okresie wędrówki pseudoplazmodium następuje pewne zróżnicowanie myksameb, ujawniające się w odmiennej budowie jego części. W części przedniej, nieco uniesionej w górę, myksameby są wydłużone w kierunku poprzecznym do osi długiej, ściślej do siebie przylegają i połączone są z błoną pochewki, stanowiącej w czasie ruchu pewien punkt oparcia (Bonner, Adams 1958).

Obok różnicy w układzie myksameb, występuje jeszcze różnica w ich zachowaniu się przy barwieniu hematoksyliną i barwnikami przyżyciowymi, a także przy stosowaniu reakcji PAS na węglowodany nie należące do typu skrobi i glikogenu (Bonner 1952, Bonner i współpracownicy 1955). Na początku migracji całe pseudoplazmodium barwiło się hematoksyliną jednostajnie, z czasem tylna część zaczynała się barwić silniej niż przednia (Bonner 1944). Przy barwieniu barwnikami przy-

życiowymi, jak czerwień obojętna, siarczan błękitu nilu albo brąz Bismarcka, już w krótkim czasie po zabarwieniu równomiernym zaczyna zaznaczać się różnica: część przednia nie zmienia się, pozostała staje się coraz bledsza. Proces utraty zabarwienia jest odwracalny. Jeżeli przeciąć pseudoplazmodium wzdłuż granicy między częścią zabarwioną i odbarwioną i oddzielić je od siebie, to po pewnym czasie na wierzchołku części bezbarwnej pojawi się pewien obszar zabarwiony, a na dole zabarwionego wierzchołka — pas bezbarwny. Co jest przyczyną zmian w zabarwieniu i jakich zmian w komórkach są one wyrazem, nie wiadomo. Przypuszczalnie jest to proces oksydacji i reoksydacji.

Jeszcze wyraźniejszą różnicę między częściami pseudoplazmodium można wykazać, stosując reakcję PAS (reakcja Schaffa, barwienie fuksyną z kwasem siarkawym). Wobec tego, że tej reakcji przeszkadzają skrobia i glikogen, występujące w cytoplazmie myksameb w ciągu całego cyklu rozwoju, należy się ich pozbyć, poddając materiał badany działaniu ptyaliny. Przy stosowaniu reakcji PAS wierzchołek pseudoplazmodium i drobny skrawek części tylnej pozostają prawie bezbarwne, gdy pozostała część zabarwia się z powodu wypełnienia się komórek ciemnymi ziarenkami.

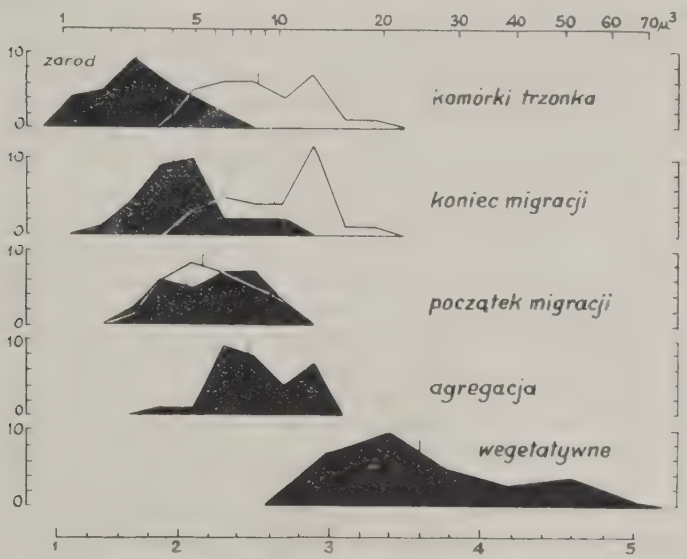
Wymienionym różnicom towarzyszy różny przebieg zmian zachodzących w rozmiarach komórek i ich jąder. Już w okresie skupiania się myksameb, zmniejszają się ich średnie rozmiary z 11 na 7 μ. W czasie wędrówki występuje różnica między komórkami w związku z ich umiejscowieniem. Komórki tylnej części tylko nieznacznie stają się większe, gdy myksameby przedniej części w końcowym okresie migracji zwiększają swoją objętość bardzo wyraźnie (Bonner, Frascella 1953).

Jednocześnie ulegają zmianie rozmiary jąder (rys. 5) barwionych metodą Feulgena (Bonner, Chiquoine, Kolderie 1955); zmniejszają się one w okresie skupiania się myksameb średnio z 3.6 do 2.7 μ średnicy. W czasie wędrówki następuje różnicowanie się rozmiarów jądra zależnie od położenia komórek. W myksamebach, znajdujących się w przedniej części pseudoplazmodium, jądra w końcowej fazie wędrówki zwiększają swoją objętość, gdy w pozostałej masie ulegają dalszemu zmniejszeniu, które trwa aż do przekształcenia się ich w mikrocysty, w których rozmiary jąder średnio wynoszą 1,9 μ.

Czas trwania wędrówki pseudoplazmodium, jak również jej szybkość, zależne są w pewnym stopniu od warunków zewnętrznych.

Nie bez wpływu jest jakość podłoża. Na normalnie stosowanych pożywkach agarowych, przy innych warunkach optymalnych, czas wędrówki waha się w granicach kilku godzin do paru dni. Przeniesienie na agar głodowy powoduje przedłużenie wędrówki do kilku dni, rzadko ponad 10 (Raper 1940b).

W celu zbadania działania elektrolitów i związków organicznych, znajdujących się w podłożu, na zachowanie się pseudoplazmodium Slifkin i Bonner (1952) wycinali z kultury będącej w okresie agregacji krążki o 10 mm średnicy, przenosili je do naczyńka szklanego zawierającego badany roztwór. Po pewnym czasie powstaje pseudoplazmo-



Rys. 5. Rozmiary jądra *Dictyostelium discoideum* w różnych stadiach rozwoju. Pole niezaciemnione odnosi się do przedniej części pseudoplazmodium i trzonka (wg Bonnera, Chiquoine, Kolderie, *J. Exp. Zool.*, **130**: 140, 1955).

dium wędrujące. Wszystkie roztwory, zależnie od koncentracji, w większym lub mniejszym stopniu skracały czas wędrówki w porównaniu z krążkiem znajdującym się w wodzie. Związki organiczne jak glikoza, sacharoza i dl-alanina przy silniejszej koncentracji skracały go w jednakowym stopniu. Ze związków mineralnych najsilniejszy był wpływ fosforanu dwusodowego. Chlorki: sodowy i wapniowy działały podobnie, lecz słabiej. Wpływ roztworów jest trudny do wyjaśnienia. Nie można przyjąć działania osmotycznego, gdyż roztwory różnych związków działały rozmaicie intensywnie pomimo jednakowej wartości osmotycznej.

Drugą cechą podłoża, mającą wpływ na czas wędrówki, jest kwasota. Według Rapera (1940b) w granicach *pH* 5.5-7.0 czas trwania wędrówki i jej szybkość nie ulega zmianie; poza tymi granicami ruch

staje się powolniejszy i prędzej ustaje. Obserwacja, że pseudoplazmodium zwraca się ku miejscu o niższej wartości *pH* nie znalazła potwierdzenia w doświadczeniach Bonnera (1959).

W temperaturze 26-28° pseudoplazmodium nie rozpoczyna wędrówki, lecz bezpośrednio rozpoczyna budowę sorokarpu, przy 15-16° wędrówka może trwać do 24 godzin. Przy temperaturze optymalnej 20-24°, ruch pseudoplazmodium trwa 3-10 godzin, a szybkość jego wynosi 1-2 mm na godzinę. Podniesienie temperatury do 28° powoduje zahamowanie ruchu, pseudoplazmodium kurczy się. Jeżeli po krótkim czasie nastąpi powrót do temperatury optymalnej, wydłuża się, rozpoczyna ponownie wędrówkę, pozostawiając jednak na miejscu postoju trochę komórek zwakuolizowanych i śluz, co dowodzi, że już rozpoczęło się tworzenie sorokarpu (Raper 1940b).

W warunkach zwykłych hodowli, w zamkniętych szalkach albo probówkach, rozwój *D. discoideum* odbywa się w atmosferze nasyconej lub prawie nasyconej parą wodną. Obniżenie stopnia nasycenia przez otwarcie szalki powoduje zahamowanie ruchu, a gdy trwa ono dłużej, następuje rozpoczęcie budowy sorokarpu. Zapobiegając obniżeniu się wilgotności, można utrzymać ruch pseudoplazmodium, podnosząc temperaturę nawet do 32°. Taki wynik doświadczeń skłonił do wyrażenia poglądu (Bonner, Shaw 1957), że wpływ temperatury jest pośredni; wzrost jej powoduje spadek wilgotności atmosfery, co decyduje o zachowaniu się pseudoplazmodium.

W ciemności i w świetle rozproszonym ruchy pseudoplazmodiów na powierzchni agaru są bezładne, poruszają się one niezależnie od siebie w różnych kierunkach. Gdy istnieje różnica w natężeniu światła, zwracają się ku silniejszemu. Wyraźniej jeszcze ujawnia się wpływ światła na kierunek ruchu przy jednostronnym oświetleniu. Pseudoplazmodia zwracają się wierzchołkami ku źródłu światła i poruszają się w jego kierunku. Światło nadaje kierunek ruchu, ale nie jest źródłem energii ani wywołującą go siłą. Działa jak bodziec, a miejscem jego przyjęcia i reakcji jest przednia część pseudoplazmodium. Odcięcie $^1/_8$-$^1/_{10}$ części długości powoduje zahamowanie ruchu, porusza się dalej tylko odcięta część przednia, pozostały trzon staje się nieruchomy, niewrażliwy na światło, zaokrągla się, rozpoczynając budowę sorokarpu. Gdy kierunek światła ulega zmianie, wierzchołek zwraca się ku światłu pociągając za sobą całość. Przy zmianie kierunku światła o 180° pseudoplazmodium dopiero po pewnym czasie obraca się wierzchołkiem ku światłu i rozpoczyna wędrówkę w przeciwnym kierunku (Raper 1940b). Nie ma różnicy w działaniu światła o różnej długości fal (Bonner i współpracownicy 1950).

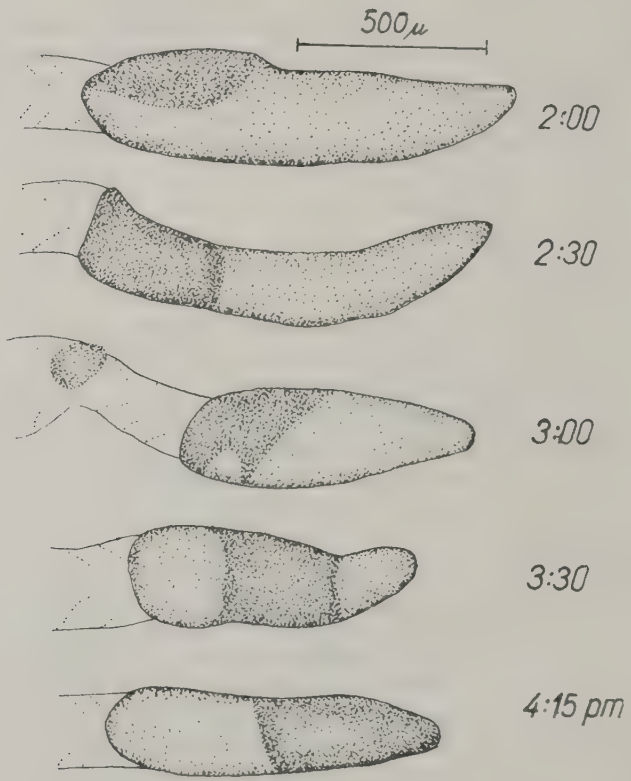
Jednoczesne badania nad określeniem stopnia wrażliwości na różni-

ce ocieplenia podłoża wykazały, że jest on bardzo wysoki. Pseudoplazmodium odczuwa różnicę wynoszącą 0.09-0.05°/cm. Wobec tak czułej reakcji na różnicę ciepłoty mogło się wydawać, że nie istnieje reakcja fotochemiczna, a wpływ światła można sprowadzić do różnicy ogrzania dwu miejsc pseudoplazmodium. Pogląd ten został podważony przez doświadczenia G a m b l e' a (1953), który zastosował jako źródło światła bakterie i barwniki świecące. Światło to było dostatecznie intensywne, aby wywołać reakcję pseudoplazmodium, lecz zbyt słabe, aby mogło powodować podniesienie ciepłoty. Wobec tego trzeba przyjąć istnienie u pseudoplazmodium *D. discoideum* silnie rozwiniętej wrażliwości na działanie obu czynników.

Szybkość ruchu pseudoplazmodium jest różna, waha się w granicach 0,3-2 mm na godzinę. Porównując ją u pseudoplazmodiów różnych rozmiarów, stwierdzono, że większe poruszają się szybciej od mniejszych (B o n n e r, E l d r e d g e 1945, B o n n e r, K o o n t z, P a t o n 1953). Potwierdzeniem zależności między objętością pseudoplazmodium a szybkością jego ruchu są obserwacje kultur, w których jednocześnie określano w różnym czasie wędrówki zmianę objętości pseudoplazmodiów i szybkość ich ruchu. Wskutek straty pewnej ilości myksameb, pozostawianych w odrzucanej pochewce, oraz z powodu zmniejszania się objętości poszczególnych głodujących myksameb, zmniejszają się rozmiary pseudoplazmodium, jednocześnie ruchy jego stają się powolniejsze. Wyjaśnienie tej zbieżności opiera B o n n e r (1959b) na hipotezie, że siła decydująca o ruchu pseudoplazmodium pochodzi nie tylko od warstwy myksameb leżących na powierzchni, ale od całej masy. Wszystkie myksameby poruszają się jednocześnie w jednym kierunku, lecz jak wykazują doświadczenia (B o n n e r 1952, B o n n e r, A d a m s 1958), nie koniecznie z tą samą szybkością. Dowodzą tego doświadczenia z nakładaniem przedniej części pseudoplazmodium zabarwionego siarczanem błękitu Nilu na koniec bezbarwnego (rys. 6) albo na kończące się skupiać myksameby. W doświadczeniach pierwszego rodzaju już w krótkim czasie zabarwione myksameby znajdowały się na wierzchołku wędrującego pseudoplazmodium, co dowodzi, że poruszały się szybciej, drążąc sobie drogę między komórkami poruszającymi się wolniej. Przy nakładaniu zabarwionego wierzchołka na bezbarwne skupiające się myksameby oczekiwano powstania pseudoplazmodium o wierzchołku zabarwionym, tymczasem nastąpiło wymieszanie się myksameb. Powstało pseudoplazmodium zabarwione jednostajnie, co mogło nastąpić tylko wskutek różnicy szybkości ich ruchu. Z tych doświadczeń wynika, że myksameby poruszają się z różną szybkością, a najszybsze z nich zajmują miejsce w części wierzchołkowej, odgrywającej w życiu pseudoplazmodium kierowniczą rolę. Wskazują na nią obserwacje jego zachowania się względem czynników

zewnętrznych, o którym była mowa wyżej i następujące bardzo pomysłowe doświadczenia Rapera (1940b).

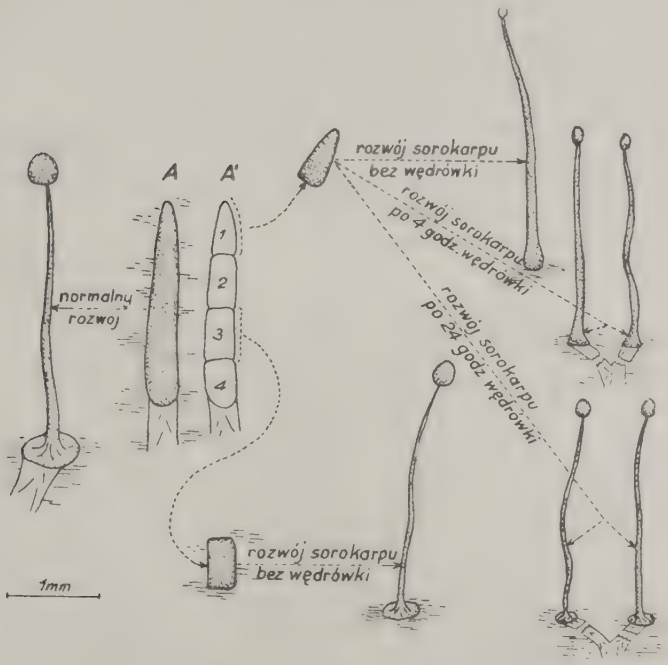
Gdy w czasie bezładnej wędrówki dwa pseudoplazmodia zetkną się wierzchołkami, a wzajemne ułożenie ich osi długich będzie odpowiednie,



Rys. 6. Ruch zabarwionego wierzchołka umieszczonego w tylnej części nienaruszonego, wędrującego pseudoplazmodium (wg Bonnera, *Amer. Naturalist*, **86**: 87, 1952)

może nastąpić ich połączenie i dalsza wspólna wędrówka. Niekiedy znowu duże pseudoplazmodium ulega podziałowi, który rozpoczyna się od podziału wierzchołka; dwie jego połowy oddzielają się od siebie, powodując rozdarcie dalszej partii na dwie części, z których każda wędruje osobno i buduje swój sorokarp. Po przecięciu pseudoplazmodium poprzecznie część wierzchołkowa wędruje dalej, część tylna kurczy się i buduje

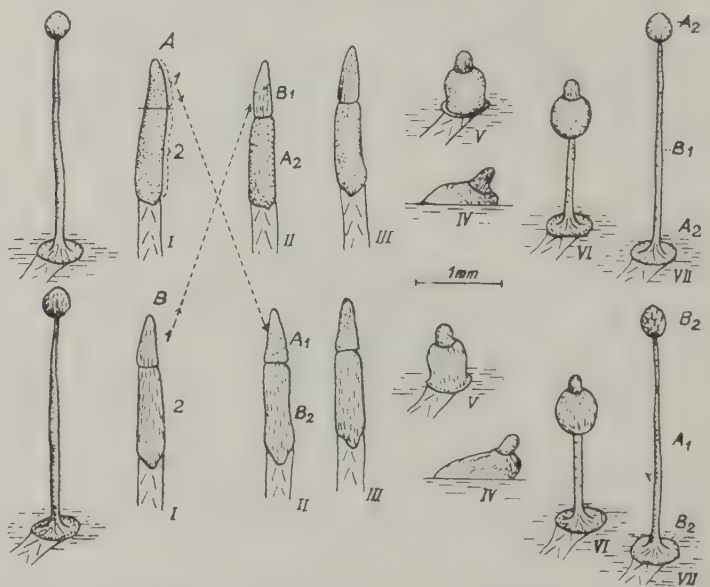
normalny, tylko mniejszy sorokarp. Jeżeli jednak dosyć wcześnie nałożyć na nią jej własny, albo inny wierzchołek, ponownie rozpoczyna wędrówkę. Inaczej zachowuje się wierzchołek, gdy go nałożyć na tylny koniec albo z boku pseudoplazmodium. Wtedy nie następuje połączenie. wierzchołek, albo gdy nałożono ich więcej, wierzchołki, oddalają się i wędrują osobno. Po pewnym czasie odcięty wierzchołek pseudoplazmodium buduje sorokarp, a wygląd jego zależny jest od czasu trwania



Rys. 7. *Dictyostelium discoideum.* Budowa sorokarpu może nastąpić z każdej części pseudoplazmodium. Czas migracji wpływa na wygląd sorokarpu (wg Rapera, *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **56**: 274, 1940)

wędrówki. Sorokarp powstały bezpośrednio po jego odcięciu odznacza się nieproporcjonalnie długim trzonkiem, bardzo drobnym sorusem i brakiem dyska. Im dłużej trwa wędrówka, tym stosunek trzonka do sorusa staje się normalniejszy, pojawia się dysk, w końcu powstały sorokarp różni się tylko rozmiarem od pochodzącego z nienaruszonego pseudoplazmodium (rys. 7). Dalsze bardzo piękne doświadczenia wyjaśniły odchylenia od normy sorokarpu, formującego się z bezpośrednio odcię-

tego wierzchołka pseudoplazmodium. Wykazały jednocześnie, że w okresie końcowego różnicowania się o losie pojedynczych myksameb decyduje ich miejsce w pseudoplazmodium. Raper hodował *D. discoideum* w warunkach optymalnych lecz z różnymi bakteriami; jedne z *Escherichia coli* drugie z *Serratia marcescens*. Otrzymał pseudoplazmodia bezbarwne i zabarwione czerwono. Po ścięciu wierzchołków, nałożył wierzchołek czerwony na resztę pseudoplazmodium bezbarwnego i odwrotnie. Po pewnym czasie wędrówki powstały sorokarpy. Bezbarwne pseudoplazmodium z czerwonym wierzchołkiem dało sorokarp o czerwonym trzonku, a bezbarwnym sorusie i dysku. Czerwone z bezbarwnym wierzchołkiem przekształciło się w sorokarp z bezbarwnym trzonkiem, a czerwonym sorusem i dyskiem, tylko różnica zabarwienia w tym wypadku była mniejsza (rys. 8). Z tych doświadczeń wynika, że myksameby znajdujące się w przedniej części pseudoplazmodium są przeznaczone na budowę trzonka, reszta na mikrocysty.



Rys. 8. *Dictyostelium discoideum*; I — A — bezbarwne pseudoplazmodium (kropkowane), I — B — czerwone pseudoplazmodium (kreskowane, zabarwione przez pochłonięte komórki pałeczki cudownej), II i III — pseudoplazmodia ze zmienionymi wierzchołkami, IV, V i VI — formowanie się sorokarpów, VII — sorokarpy dwubarwne. Zabarwienie trzonka takie, jakim było zabarwienie nałożonego wierzchołka: myksameby wierzchołka pseudoplazmodium budują trzonek (wg Rapera, *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 56, 1940).

Stosunek ilościowy myksameb przeznaczonych na budowę trzonka do przeznaczonych na mikrocysty jest dla określonych warunków stały (Bonner, Slifkin, 1949). Do tego twierdzenia doprowadziły pomiary licznych barwionych pseudoplazmodiów dzielonych na części, które bezpośrednio mierzono albo stosowano do obliczeń ich objętości tablice Turrela. Kultury trzymano w różnych temperaturach stałych albo zmiennych, w ciemności i na świetle rozproszonym. W pseudoplazmodiach wyhodowanych w ciemności i temperaturze 21-24° przyszłe komórki trzonka stanowiły średnio 14,1 ± 6,26%. W kulturach hodowlanych na świetle procent komórek trzonka wzrastał średnio do 24 ± 5,5%, bez względu na rozmiary sorokarpu. Stosunek ulegał zmianie, gdy po paru dniach trzymania kultury w temperaturze optymalnej przenoszono ją do temperatury 27°. Wtedy ilość komórek trzonka spadła średnio do 2,2 ± ± 3,39%. Wpływ temperatury na stosunek komórek trzonka do ilości mikrocyst ujawnia się tylko wtedy, gdy podniesienie temperatury następuje w okresie morfogenetycznym. W okresie wegetatywnym i agregacji zmiany temperatury nie decydują o formie sorokarpu.

Już w okresie wędrówki pseudoplazmodium, jak była o tym mowa, następuje pewne różnicowanie się myksameb, jednakże nie sięga ono głęboko. Wystarczy pseudoplazmodium rozetrzeć, aby uwolnione myksameby powróciły do stadium wegetatywnego, gdy w ich otoczeniu znajdują się bakterie, albo gdy ich nie ma — zaczęły budować sorokarp. O tym samym świadczą doświadczenia Rapera (1940b) z pseudoplazmodium pociętym na części, z których każda buduje sorokarp (rys. 6).

Właściwy proces różnicowania nieodwracalnego rozpoczyna się z budową sorokarpu, czyli w ostatnim stadium — kulminacji.

Budowa sorokarpu — kulminacja. Budowa sorokarpu budziła duże zainteresowanie od pierwszej chwili poznania gatunków rodzajów *Dictyostellium* i *Polysphondylium*. Zajmowali się nią Brefeld (1869, 1884), Olive (1902), a następnie inni badacze. Budowa sorokarpu *D. discoideum* była przedmiotem badań Bonnera (1944, 1952), Rapera (1940), Sussmana (1956), a przede wszystkiem stanowiła główne zagadnienie pracy Rapera i Fennell (1952).

Po skończonej wędrówce wierzchołek pseudoplazmodium zatrzymuje się, a pozostała reszta ściąga się w masę mniej więcej kulistą, z wierzchołkiem sterczącym wprost ku górze. W połowie sterczącego wierzchołka pojawia się błonka, obejmująca w postaci rurki część komórek i wydłużająca się ku podstawie, jednocześnie wierzchołek staje się niższy, a pozostała masa bardziej płaska. Przednia część pseudoplazmodium składała się z komórek wydłużonych, ściśle ułożonych poprzecznie do osi długiej, na samym wierzchołku znajdowała się drobna grupa komórek o kształtach zaokrąglonych. Ona to, pociągając za sobą inne ko-

mórki, przeciska się przez masę myksameb aż do podłoża (Bonner 1952); po osiągnięciu go myksameby ulegają wakuolizacji, objętość ich wzrasta prawie o 100% (z 4,5-5,0 do 8-8,5 μ). Błona rurki tężeje, komórki wskutek wzajemnego ucisku stają się polyedryczne, a pokrywając się błoną z celulozy, tworzą tkankę podobną do tkanki parenchymatycznej roślin wyższych (rys. 10). Cytoplazma wraz z jądrem zostaje zepchnięta ku ścianie, ulega degeneracji — komórki trzonka stają się martwe. Jednocześnie takim samym zmianom ulega dolna warstwa całej masy. Powstaje z niej mniej lub bardziej stożkowaty dysk, stanowiący oparcie dla wydłużającego się trzonka, zapewniając prostopadłą pozycję sorokarpu. Błonka, która tworzy rurkę obejmującą różnicujące się komórki, początkowo jest rodzajem siatki przeplatających się nieregularnie bardzo delikatnych włókienek, skierowanych przeważnie w kierunku długości trzonka; stopniowo, począwszy od podstawy, staje się coraz bardziej tęga, sztywniejsza, w końcu swoim wyglądem przypomina celofan. Błonka ta, stanowiąca następnie pochewkę trzonka, daje reakcje charakterystyczne dla celulozy, której obecność potwierdziły obrazy otrzymane za pomocą mikroskopu elektronowego (Mühlethaler, 1955, Gazelius i Rånby, 1957). Powstanie i mechanizm jej budowy nie jest dostatecznie znany, nie wiadomo bowiem, czy wszystkie myksameby biorą udział w jej budowie, czy tylko znajdujące się wewnętrz rurki. Błonka nie jest związana z żadnymi komórkami, należy więc przypuszczać, że powstaje ona poza nimi z wydzielanego przez nie materiału wraz z enzymami czynnymi w procesie syntezy celulozy. Gdy zostaje zakończona budowa dyska, a trzonek wydłuża się przez różnicowanie się dalszych myksameb, pozostała ich masa, nazwana sorogenem (Harper 1926), odrywa się od dyska i zaczyna podnosić się ku górze. W tym okresie sorogen przedstawia się jako lepka, ciągliwa masa, otoczona śluzową błonką, która z czasem ulega zniszczeniu. Skupione w sorogenie myksameby nie są pozbawione możności wykonywania ruchów ameboidalnych, które u pewnych gatunków mogą stanowić wystarczającą „siłę podnoszącą". U *D. discoideum*, gdzie chodzi o wznoszenie się sorogenu jako całości, proces ten jest bardziej skomplikowany i trudny do wyjaśnienia, tym bardziej że w sorogenie rozpoczyna się przekształcanie myksameb w nieruchome mikrocysty. Na udział myksameb w ruchu sorogenu występuje różnica poglądów: Bonner podaje, że proces przekształcania się myksameb w mikrocysty odbywa się bardzo szybko, tak że nie można ich zdolności ruchu brać pod uwagę. Natomiast Raper i Fennel stwierdzają, że proces ten jest stopniowy i powolny. Chociaż z czasem rola ruchu myksameb maleje, ma on jednak swoje znaczenie.

Przekształcanie się myksameb sorogenu w mikrocysty pokryte błoną zawierającą celulozę rozpoczyna się w górnej jego części i na powierzch-

ni: najwolniej przebiega ono w dolnej środkowej części. W tym obszarze myksameby są wydłużone, pochylone w stronę trzonka, a ułożone zwarto, ściśle go obejmują. W trzonku, mniej więcej w połowie wysokości sorogenu, odbywa się najżywsze różnicowanie jego komórek, dzięki czemu w rurce utrzymuje się stale ciśnienie ku górze. Świadczy o nim odchylenie od błonki ku górze komórek leżących powyżej tej strefy i rozszerzenie wierzchołka rurki, tak że przyjmuje ona kształt lejka opierającego się o podłoże, a więc zamkniętego. W obszarze stykania się pochewki trzonka z aktywną częścią sorogenu jest ona jeszcze elastyczna, a panujące w niej ciśnienie współdziała z ruchem myksameb. Siła kohezji występująca w sorogenie sprawia, że wznosi się on jako całość wraz z wydłużającym się trzonkiem ku górze. Myksameby, znajdujące się na wierzchołku, stanowiące materiał na komórki trzonka, są stopniowo spychane do wnętrza rurki. Odbywa się to pod naciskiem tężejącej błonki śluzowej wydzielanej przez myksameby ułożone poprzecznie do trzonka. W tym samym kierunku działa wzrastające napięcie powierzchniowe sorogenu, który w miarę przekształcania się myksameb w mikrocysty staje się masą mikrocyst pogrążonych w bardzo wodnistym płynie. Napięcie powierzchniowe dążące do nadania masie kształtu kulistego wywiera nacisk na komórki wierzchołka, wpychając je do rurki pomimo panującego tam ciśnienia o przeciwnym kierunku, a kulisty lub prawie kulisty sorus obejmuje wierzchołek trzonka.

Średnica powstałego trzonka nie jest jednostajna na całej jego wysokości: zmniejsza się ku wierzchołkowi tak, że w pobliżu i na wierzchołku objętym sorusem składa się najczęściej z jednego rzędu komórek w postaci cegiełek.

Rozmiary mikrocyst w sorusie wahają się zwykle w szerokich granicach. Kultury pochodzące z jednej mikrocysty dawały mikrocysty, których rozmiary wahały się w tych samych granicach, bez względu na wielkość mikrocyst, od których pochodziły. Granice rozmiarów mikrocyst uległy zmianie, gdy do kultury użyto myksameb pochodzących z wierzchołka pseudoplazmodium. W sorusie takiej kultury przeważały mikrocysty większe (Bonner 1959).

Wyniki badań fizjologicznych i cytochemicznych

Dictyostelium discoideum przedstawia szczególnie dogodny materiał dla badań fizjologicznych i cytochemicznych, z powodu wyraźnego rozgraniczenia różnych okresów rozwoju, jak i wczesnego, stopniowego różnicowania się komórek, prowadzącego do ostatecznego przekształcenia się myksameb w komórki trzonka i mikrocysty.

Powolny przebieg różnicowania, odbywającego się po zakończeniu okresu wegetatywnego, a więc po zupełnym przerwaniu pobierania po-

karmu, pozwala na śledzenie procesów fizjologicznych i zmian cytochemicznych jakościowych, a czasem nawet ilościowych, nie zamąconych przemianą materiału odżywczego.

Koniec wędrówki pseudoplazmodium i okresu budowy sorokarpu, a szczególnie jego początek, gdy następuje nieodwracalne różnicowanie się myksameb na komórki trzonka, jest okresem najżywszej przemiany materii. Świadczy o tym przede wszystkim intensywność procesu oddychania. Stanowił on przedmiot badań Gregga (1950). Wychodząc z założenia, że ilość azotu w organizmie myksameb nie zmienia się w ciągu całego rozwoju, przyjął on za miarę intensywności oddychania ilość pochłanianego tlenu w ciągu godziny na jednostkę azotu. Mimo że założenie to nie w pełni było słuszne, gdyż jak wykazały dalsze badania Gregga, Hackneya i Krivanka (1954), w okresie kulminacji ilość azotu zmniejsza się, nie wpłynęło to na ogólny wynik, stwierdzający zmiany ilości pochłanianego tlenu w zależności od stadium rozwoju. Najsłabsze, równomierne pobieranie tlenu odbywa się w okresach: wegetatywnym i agregacji. Wyraźnie wzrasta w czasie wędrówki pseudoplazmodium i w początkach budowy sorokarpu, aby w ciągu jej trwania stopniowo słabnąć, a po dojrzeniu mikrocyst stać się nieuchwytnym. Wzmożone oddychanie w czasie wędrówki związane jest z ruchem, a w początkach kulminacji przede wszystkim z różnicowaniem się myksameb przeznaczonych na budowę trzonka. Stopniowe zmniejszanie się ilości różnicujących się komórek jest przyczyną coraz słabszego pobierania tlenu w okresie kulminacji (Bonner 1944). Porównując pobieranie tlenu przez pseudoplazmodia i formujące się sorokarpy różnych rozmiarów, Gregg wykazał, że okazy mniejsze pochłaniają stosunkowo więcej tlenu niż okazy większe. Objaw ten wyjaśnia wpływem stosunku powierzchni do objętości, który jest większy u okazów mniejszych. Powoduje to istnienie większej siły kohezyjnej między sorogenem a trzonkiem u okazów mniejszych. Pozostaje to w zgodzie z obserwacją, że mniejsza masa przyszłych mikrocyst podnosi się wolniej w czasie kulminacji niż większa, musi bowiem pokonać większą siłę kohezyjną, co wymaga więcej czasu i energii na jednostkę wysokości. Stąd powstała hipoteza (Bonner, Eldredge 1945), że siły wywołujące ruchy morfogenetyczne nie są siłami powierzchniowymi lecz wewnętrznymi, pochodzącymi od wszystkich komórek.

Po zakończeniu okresu wegetatywnego, a z nim odżywiania się myksameb, oddychaniu musi towarzyszyć ubytek suchej masy, którego określenie z powodu małej zawartości substancji stałej nie było zadaniem łatwym. Zostało ono rozwiązane przez zastosowanie dwu metod: wagowej i izotopowej (Gregg, Bronsweig 1956). Do pożywki dodawano izotop, fosfor^{32}. Pobierały go bakterie, a wraz z nimi myksameby.

Pseudoplazmodia wyrośnięte w tych kulturach dzielono na dwie równe części. Jedną z nich suszono w temperaturze 60° i oznaczano suchą masę, ważąc na błonce z kolodium, a następnie oznaczano promieniowanie pochłoniętego P^{32} za pomocą licznika Geigera. Drugą połowę pseudoplazmodiów pozostawiano do powstania sorokarpów. Z sorokarpami postępowano tak samo: oznaczano suchą masę i promieniowanie P^{32}, przy czym przeprowadzono pomiary osobno trzonków i osobno sorusów. Strat przez zniszczenie pewnej części myksameb nie brano pod uwagę. Zwiększenie promieniowania na minutę i jeden mikrogram suchej masy wskazywało na jej zmniejszenie się. Strata wynosiła 6,6%, jednakowo dla obu składników sorokarpu: trzonka i mikrocyst.

Ubytek suchej masy wskazywał na zużycie materiałów zapasowych. Analizy cytochemiczne przeprowadzone w różnych stadiach rozwojowych *D. discoideum*, wykazały, jakie zmiany zachodzą w ilości i składzie węglowodanów i związków azotowych. Ilość węglowodanów redukujących stale powiększa się w przejściu ze stadium wegetatywnego do stanu pseudoplazmodium o 18%, w budującym się sorokarpie o 44,2% w stosunku do myksameb w stadium wegetatywnym, a że nie wszystkie węglowodany wywołują redukcję, ilość ich zatem była większa, niż wykazała to analiza.

Wright i Anderson (1958) podają, że maksimum zawartości heksoz przypada w okresie wędrówki pseudoplazmodium, a w nich fruktoza stanowi 10-15%. Jak wskazuje tabela I, ubytek suchej masy nie odbył się kosztem węglowodanów, a więc należało szukać strat w związkach azotowych.

Tabela I

Zawartość węglowodanów redukujących w różnych stadiach rozwojowych (w % s. m.) (Gregg, Bronsweig 1956 b)

Stadium rozwojowe	Węglowodany
Myksameby	8,67
Pseudoplazmodium	10,3
Sorokarp	12,5
Trzonek	12,2
Mikrocysty	10,8

Stosunek azotu do suchej masy w pierwszych okresach rozwojowych jest stały, dopiero w czasie intensywnego różnicowania się myksameb i ruchów morfogenetycznych następują straty w absolutnej ilości azotu i zwiększenie się niebiałkowych związków azotu kosztem rozpuszczalne-

go i nierozpuszczalnego białka (Gregg, Hackney, Krivanek 1954). Zmiany te występują przede wszystkim, jak wykazały osobne analizy trzonków i mikrocyst, w związku z różnicowaniem się myksameb budujących trzonek (tabela II). W masie przekształcających się myksameb

Tabela II

Zawartość związków azotowych w różnych stadiach rozwojowych (w % s. m.)

Azot	Stadium rozwojowe				
	myksameby	pseudoplazmodium	sorokarp	sorus	trzonek
całkowity	10,30	9,36	7,99	9,59	4,73
rozpuszczalny	5,70	6,81	4,49	6,20	3,30
rozpuszczalny białkowy	4,75	5,66	2,81	2,63	0,987
nierozpuszczalny białkowy	0,999	1,36	2,31	1,86	1,71
całkowity nierozpuszczalny	5,22	3,77	3,61	4,83	2,00
białkowy rozpuszczalny i nierozpuszczalny	9,97	9,43	6,42	7,46	2,98

w mikrocysty straty w azocie białka rozpuszczalnego pokrywają inne związki, tak że różnica w ilości całkowitego azotu jest stosunkowo nieznaczna, w porównaniu z utraconym azotem przez komórki trzonka. Wobec znacznej utraty białka, nasuwa się wniosek, że jest ono źródłem energii, jak również materiałem na budowę celulozy wchodzącej w skład błon mikrocyst, ścian komórek trzonka i okrywającej go błony. Zapas węglowodanów znajdujących się w komórkach jest niewystarczający na budowę tak znacznej ilości celulozy.

Badania cytologiczne posiadają charakter jakościowy, jednakże na podstawie porównania obrazów z różnych okresów życia pozwalają wysnuć pewne wnioski o przebiegu zmian, towarzyszących procesowi różnicowania myksameb.

Materiałem badań było *D. discoideum* w różnych okresach rozwoju, pozbawione bakterii. Przeprowadzano je na świeżym, bądź na utrwalonym i barwionym materiale. Gdy chodziło o pseudoplazmodium lub tworzący się sorokarp, sporządzano pożywki z dodatkiem siarczanu błękitu Nilu. Przyżyciowo zabarwiony materiał utrwalano, odwadniano i zatapiano, a odpowiednie reakcje przeprowadzano na skrawkach o grubości 6-10 μ.

Poza okresem wegetatywnym rozróżniano stadia rozwojowe: 1) wędrujące pseudoplazmodium, w którym odróżniano część przednią obejmującą mniej więcej $^1/_3$ jego długości i pozostałą tylną, przeznaczoną na mikrocysty — sorogen; 2) okres przedkulminacyjny, gdy pseudoplazmo-

dium zatrzymuje się na miejscu, oś jego przyjmuje położenie pionowe, a sorogen zaczyna odrywać się od podłoża; 3) okres kulminacji, w którym odbywa się budowa trzonka, sorogen wznosi się na nim, lecz nie dosięga jeszcze jego wierzchołka; 4) dojrzały sorokarp; na wierzchołku trzonka masa zarodników skupiona w sorus. W tych okresach rozwoju *D. discoideum* Bonner, Chiquoine i Kolderie (1955), Krivanek i Krivanek (1958) określali występowanie związków budujących komórkę, jak i enzymów kierujących jej przemianą materii.

Białko wykrywano metodą Mazia, polegającą na barwieniu preparatów błękitem bromofenolowym z chlorkiem rtęci w 95% etanolu. Zabarwieniu ulegają białka związane, jak lipoproteidy, fosfoproteidy, glikoproteidy i inne. Znajdują się one we wszystkich komórkach w ciągu całego cyklu rozwoju. W myksamebach pseudoplazmodium występują jako drobna ziarnistość, obok której znajdują się dwa lub trzy większe skupienia. Błona jądra i komórki posiada 2-4 wypukleń o strukturze ziarnistej, stanowiące część błony albo może tylko do niej przyczepione. Nieznaczne zabarwienie występuje także w błonce śluzowej, okrywającej całe pseudoplazmodium. Obraz komórek w okresie przedkulminacyjnym jest podobny. W komórkach ulegających wakuolizacji barwi się powstająca ściana komórkowa i resztki protoplazmy. W czasie kulminacji myksameby przekształcające się w mikrocysty stają się coraz ciemniejsze z powodu większych ziarenek w cytoplazmie i ciemniejszego zabarwienia jej samej. Dojrzałe mikrocysty barwią się jednostajnie, nie dostrzega się w nich ziarnistości. Obecność białka stwierdza się w ścianach komórek trzonka oraz w pokrywającej go błonie. Nasuwa się przypuszczenie, że białko stanowi składnik mucyny, substancji bezkształtnej, opisanej przez Mühlethalera (1956), w której pogrążone są fibrile celulozy.

Obecność kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) w jądrach stwierdzono za pomocą metody Feulgena. Najlepszy rezultat dawało stosowanie jako utrwalacza płynu Zenkera w ciągu 2-4 godzin, następnie poddanie materiału hydrolizie w kwasie solnym przez 3 minuty do godziny. Zabarwienie jąder było słabe, można więc sądzić, że ilość DNA jest w nich mała. Za pomocą tej metody stwierdzono, że rozmiary jąder ulegają zmianie w czasie rozwoju i że w okresie wędrówki pseudoplazmodium odbywają się podziały jądra i komórek.

Kwas rybonukleinowy (RNA) znajduje się w cytoplazmie wszystkich komórek, zarówno w wędrującym pseudoplazmodium, jak w dojrzałym sorokarpie. Rozmieszczenie RNA w komórkach jest równomierne, tylko w okresie przedkulminacyjnym i kulminacji występuje koncentracja jego ziarenek w komórkach ułożonych prostopadle do osi, w ich części sąsiadującej bezpośrednio z pochewką trzonka, a więc

w obrębie najgłębiej sięgającego różnicowania komórek. Można obecność jego stwierdzić jeszcze w ulegających wakuolizacji i już zwakuolizowanych komórkach trzonka. W myksamebach przeznaczonych na mikrocysty, w okresie przedkulminacyjnym, widoczna jest ziarnistość, która w okresie późnej kulminacji i w dojrzałych mikrocystach zmienia się w jednolite zabarwienie. W okresie wędrówki pseudoplazmodium i do połowy kulminacji w jądrach wszystkich komórek dostrzega się zabarwione ciałko, prawdopodobnie jąderko. W późniejszym stadium rozwoju przypuszczalnie jąderko staje się niewidoczne. (Do wykrycia kwasu rybonukleinowego stosowano mieszaninę zieleni metylowej i pyroniny — barwnik Pappenheima-Saathofa — barwiącej DNA zielono, a RNA czerwono. Rozkład RNA przeprowadzano za pomocą roztworu rybonukleinazy, zawierającego 0,1 mg enzymu na 1 cm^3 wody destylowanej albo fizjologicznego roztworu soli).

W końcu okresu wegetatywnego, w coraz liczniejszych myksamebach pojawiają się ziarenka metachromatyczne, barwiące się błękitem toluidyny, a w ciągu agregacji i w dalszych stadiach rozwojowych występują one we wszystkich komórkach. W myksamebach są one rozproszone w cytoplazmie, w mikrocystach skupione są w pobliżu jądra. Z obserwacji nad zachowaniem się myksameb, po uwolnieniu ich z pseudoplazmodium w obecności bakterii, gdy powracają one do stanu wegetatywnego, wynika, że znikają z nich ziarenka metachromatyczne. Gdy zaczynają się skupiać, wtedy metachromazja pojawia się w nich ponownie. Bonner (1959), przypuszczając, że istnieje jakiś związek między wrażliwością na działanie akrazyny a pojawieniem się ziarenek metachromatycznych, porównywał czas występowania tych zjawisk. Obserwacje nie potwierdziły tego przypuszczenia: metachromazja wyprzedza pojawienie się wrażliwości na obecność akrazyny.

Stosując kwaśną metodę Schaffa (PAS), można uchwycić występowanie i zmiany, jakim ulegają wielocukry w komórkach, tak co do ilości, jak co do zachowania się względem tej reakcji. W okresie wegetatywnym i skupiania się wielocukry przepajają cytoplazmę albo, skoncentrowane w drobne ziarenka zabarwione czerwono, ułożone są w pobliżu jądra. Przy końcu agregacji i na początku wędrówki pseudoplazmodium jego myksameby barwią się jednostajnie, a delikatna śluzowa błonka pokrywająca je daje również pozytywną reakcję PAS.

W czasie wędrówki pseudoplazmodium następuje zmiana, występuje różnica między częścią przednią a tylną przeznaczoną na mikrocysty, która zabarwia się silnie, jej komórki wypełnione są drobnymi ciemnymi ziarenkami. Mniejsza część przednia jest jaśniejsza, w jej komórkach znajdują się tylko nieliczne, nieco większe, nieforemne ziarenka. Poprzeczna granica między tymi częściami jest wyraźna, niekiedy tylko

jaśniejszy klin wbija się w część ciemniejszą. W czasie migracji komórki części przedniej wydłużają się poprzecznie do osi długiej pseudoplazmodium, a w okresie kulminacji leżące poniżej wierzchołka wydzielają wielocukry skupione w ich końcu wewnętrznym, tworząc błonkę pokrywającą trzonek. Komórki te, wchodząc powoli w skład trzonka zwiększają swoją objętość, ulegając wakuolizacji i następnie pokrywają się ścianą komórkową. Można jeszcze dostrzec w nich nieliczne drobne czerwone ziarenka. Różnice i zmiany w zabarwieniu wielocukrów, przy stosowaniu reakcji PAS w okresie migracji i początkowym stadium kulminacji, nie są wynikiem zaniku węglowodanów, lecz tylko obrazem odwracalnych zmian ich formy, barwiącej się mniej lub bardziej intensywnie. W czasie kulminacji myksameby sorogenu, przekształcając się w mikrocysty, pokrywają się błoną dającą również pozytywną reakcję PAS, a przez nią przeświecającą nieliczne ciemne ziarenka.

Obok węglowodanów dających reakcję PAS, występują wielocukry kwaśne barwiące się błękitem toluidyny w cytrynianie o $pH = 4$. W wędrującym pseudoplazmodium są one rozmieszczone równomiernie; występują w komórce jako ziarnistość cytoplazmy w ścisłym sąsiedztwie jądra. W okresie przedkulminacyjnym silniejsze zabarwienie występuje w komórkach leżących prostopadle do osi: myksameby sorogenu, jak i pokrywająca je otoczka śluzowa barwią się słabiej. W okresie kulminacji różnica w rozmieszczeniu kwaśnych wielocukrów staje się wyraźniejsza. Komórki przeobrażające się w mikrocysty wykazują bardzo obfitą ziarnistość, tak że ich jądra stają się niewidoczne. Cytoplazma komórek, przygotowujących się do budowy trzonka, barwi się jednostajnie, szczególnie silnie w sąsiedztwie pochewki trzonka. W gotowych komórkach trzonka barwią się resztki cytoplazmy, ściany komórkowe, a także błona pochewki trzonka.

Ilość obu rodzajów wielocukrów wzrasta, począwszy od wędrówki pseudoplazmodium, aż do powstania sorokarpu, co może być wskazówką ich udziału w budowie celulozy, którą można wykryć za pomocą ogólnie stosowanych reakcji w ścianie mikrocyst i komórek wchodzących w skład trzonka, a także w otaczającej go błonie. Za pomocą mikroskopu elektronowego (Mühlethaler 1955, Gazelius i Ränby 1957) stwierdzono, że celuloza występuje w postaci fibrili pogrążonych w substancji bezpostaciowej, posiadającej cechy mucyny. Fibrile, o średnicy 70-100 Å, w błonce trzonka ułożone równolegle, przebiegają bez przerwy z jednego końca w drugi, gdy w ścianach mikrocyst i komórek trzonka są one rozrzucone bezładnie. Skład chemiczny bezpostaciowej substancji towarzyszącej celulozie nie jest znany. Występowanie wielocukrów w ścianie komórek trzonka i w błonie otaczającej go

nasuwa przypuszczenie, że wchodzą one w jej skład albo może biorą udział w jej syntezie.

Z przemianami zachodzącymi w węglowodanach i budową celulozy łączy się występowanie enzymu czynnego przy powstawaniu urydynodwufosforanu-glikozy (UDPG) z urodynotrójfosforanu (UTP) i glukozo-1-fosforanu, wysoko energetycznego związku aktywnego przy syntezie celulozy. Występuje on w okresie agregacji, aktywność jego wzrasta w czasie formowania się pseudoplazmodium, w czasie migracji osiąga maksimum, w okresie budowy sorokarpu stopniowo słabnie, lecz trwa do jej zakończenia (Wright, Anderson 1958).

Obecność lipazy stwierdzano za pomocą metody Gomoriego w myksamebach we wszystkich okresach ich życia. Jest ona równomiernie rozmieszczona w pseudoplazmodium, nie była czynna jedynie w samym jego wierzchołku. W okresie przedkulminacyjnym działalność lipazy była silniejszą w obszarze komórek przyszłego trzonka niż przyszłych mikrocyst, co utrzymywało się także w okresie kulminacji. W trzonku najczynniejsze jest miejsce znajdujące się bezpośrednio pod sorogenem, wierzchołek jest nieczynny. Lokalizacja lipazy w obszarach najintensywniejszego różnicowania się komórek wskazuje na możliwość udziału lipidów w ich metabolizmie. Jednakże rola lipidów i ich stosunki z innymi związkami, jak węglowodany i białka, nie była badana.

Ogólnie można stwierdzić, że działalność 5-nukleotydazy była w okresie migracji intensywniejsza w obszarze komórek przeznaczonych na budowę trzonka niż przyszłych mikrocyst, podobnie było w okresie przedkulminacyjnym. Zmieniło się to w okresie późnej kulminacji, najczynniejsza była w dolnej części podnoszącego się sorogenu. W uformowanym sorokarpie aktywność enzymu ujawnia się tylko w masie mikrocyst. Umiejscowienie enzymu, rozkładającego nukleotydy na nukleozydy i kwas fosforowy, w okresie przedkulminacyjnym w obszarze komórek leżących poniżej grupy ułożonych prostopadle do osi, gdy te są prawie bezczynne, wskazuje na to, że w tym okresie odbywa się metabolizm kwasów nukleinowcyh i fosforanów (5-nukleotydazę wykrywano metodą Gomoriego: kwas adenilowy mięśniowy o *pH* = 8,3 poddawano działaniu badanego materiału w ciągu 4 godzin w temperaturze 37°).

Oksydaza cytochromowa jest czynna w pseudoplazmodium, lecz nie jest w nim równomiernie rozłożona. Czynniejsza jest w części przedniej, obejmującej mniej więcej $^1/_6$ długości, niż w pozostałej reszcie. W okresie przedkulminacyjnym i wczesnej kulminacji najczynniejszy jest obszar komórek przygotowujących się do budowy trzonka, gdy w sorogenie działanie enzymu było słabe. W miarę wznoszenia sorogenu w górę wzmaga się w nim czynność enzymu, jednocześnie słabnie ona

w trzonku. W dojrzałym sorokarpie oksydazy cytochromowej wykryć nie można.

Nieco odmiennie zachowanie się oksydazy cytochromowej przedstawia Takeuchi (1960). Czynność jej w okresie agregacji ulega wydatnemu osłabieniu i pozostaje słaba w pseudoplazmodium, przy czym u *D. mucoroides* jest silniejsza w części przeznaczonej na mikrocysty; u *D. discoideum* wyraźnej różnicy nie stwierdzono.

Tyrozynaza występuje tylko w śluzowej błonce otaczającej pseudoplazmodium i w resztkach cytoplazmy w komórkach trzonka. Poszukiwania tyrozynazy w okresie kulminacji w komórkach budujących trzonek, jak i przekształcających się w mikrocysty, dały różne wyniki, przypuszczalnie z tego powodu, że w okresie różnicowania się komórek reakcja odbywa się w nieidentycznych warunkach.

Oksydaza aminowa, utleniająca alifatyczne i aromatyczne aminy do aldehydów i kwasów przy jednoczesnym uwalnianiu amoniaku i nadtlenku wodoru, występuje w całym pseudoplazmodium, z wyjątkiem $^1/_{16}$ części przedniej. Po ukończeniu wędrówki najczynniejszą jest część pseudoplazmodium, leżąca bezpośrednio pod masą przyszłych komórek trzonka. Masa przyszłych mikrocyst wykazuje tylko słabą aktywność. Taki sam rozkład aktywności trwa w okresie przedkulminacyjnym. Dopiero w czasie kulminacji następuje zmiana, występują dwie strefy aktywne: część dolna posuwającego się sorogenu i strefa różnicujących się komórek trzonka. Aktywność ich, słabnąc stopniowo, utrzymuje się w czasie kulminacji. W dojrzałym sorokarpie już jej wykryć nie można.

Fosfataza zasadowa (Krivanek 1956) czynna jest w okresie wegetatywnym i agregacji. W początkowym okresie wędrówki pseudoplazmodium aktywnością odznacza się sam jego wierzchołek, w późniejszym okresie rozszerza się ona na cały obszar zajęty przez komórki przeznaczone na budowę trzonka, pozostała część jest prawie nieczynna. W okresie kulminacji ten obszar jest czynny dalej, a jednocześnie staje się aktywny sorogen. Gotowy trzonek, jak również mikrocysty, wykazują już tylko bardzo słabą działalność. Intensywną aktywność można stwierdzić w drobnej grupie komórek leżących w dolnej części pseudoplazmodium, z których powstaje dysk, posiadają one charakter komórek trzonka.

Obecność dehydrogenaz specyficznych (Wright, Anderson 1958) można wykryć już w okresie wegetatywnym. Najczynniejsze są: dehydrogenaza kwasu izocytrynowego (DPN), kwasu jabłkowego (TPN) i kwasu glutaminowego; inne działają słabiej. Po okresie agregacji aktywność dehydrogenaz wzrasta, osiągając swe maksimum w okresie tworzenia pseudoplazmodium i jego wędrówki, następnie w czasie bu-

dowy sorokarpu słabnie. W tym końcowym okresie na wysokim poziomie utrzymuje się jeszcze aktywność dehydrogenaz: kwasu izocytrynowego i jabłkowego.

Przy przejściu myksameb ze stadium wegetatywnego do stadium agregacji, czynność dehydrogenazy kwasu bursztynowego wydatnie wzrasta (Takeuchi 1960). W pseudoplazmodium dehydrogenaza jest bardziej aktywna w strefie myksameb przeznaczonych na mikrocysty, co wyraźniej zaznacza się u *D. mucoroides* niż u *D. discoideum*.

Dictyostelium polycephalum Raper

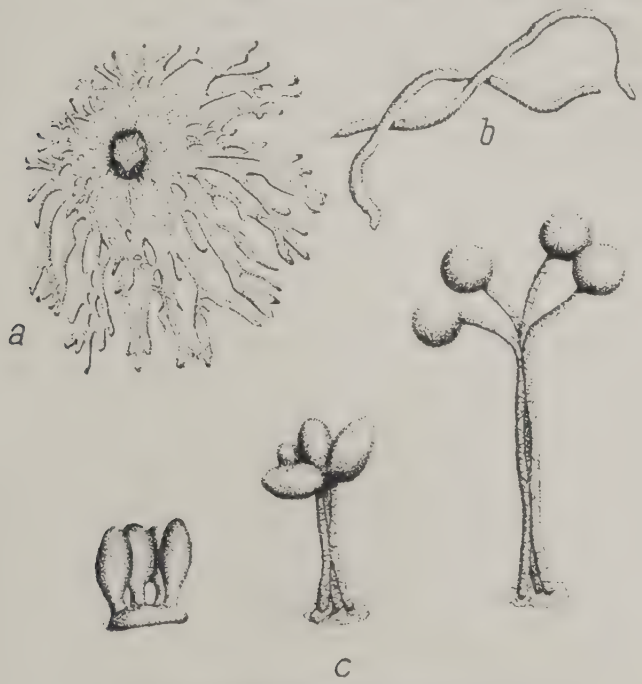
1956. *J. gen. Microbiol.* **14**; 716.

Sorokarpy bezbarwne, 375-650 μ wysokie, złożone są z wiązki trzonków złączonych z sobą w części środkowej, rozchodzących się w górnej i kończących się oddzielnymi sorusami, 45-90 μ średnicy. Trzonki wchodzące w skład koremium *, zbudowane są, z wyjątkiem podstawy złożonej z 2-3 rzędów, z jednego rzędu komórek. Połączenie trzonków w pobliżu podstawy jest luźniejsze, co pozwala określić ich ilość. Mikrocysty owalne, 6,0-7,5×3,0-3,5 μ (rys. 9).

Rozwój *D. polycephalum* podobny jest do rozwoju *D. discoideum*, albowiem pseudoplazmodium jego posiada zdolność poruszania się po podłożu. Zachodzi jednak różnica w sposobie skupiania się i tworzenia pseudoplazmodium (Raper 1956b). Do centrum nie płyną cienkie wydłużone strumienie, a krótkie szerokie pasma złożone z wydłużonych (15-20×4-6 μ) myksameb, tworzące skupienia 5-7 mm średnicy. Ze skupienia wznoszą się wypuklenia, wyrastające w długie cylindryczne kolumny, 5-10 mm długie, o średnicy nie przekraczającej 50-60 μ. Powstałe pseudoplazmodium, opadając na powierzchnię agaru, rozpoczyna wędrówkę, w czasie której tylko częściowo styka się z podłożem, w paru punktach albo tylko tylną częścią. Pseudoplazmodia wykazują tendencję poprzecznego podziału, grubość ich nie zawsze jest jednostajna. Niekiedy nawet przypominają łańcuszek paciorków. Jeżeli nastąpi przerwanie, każda część wędruje oddzielnie i tworzy osobny sorokarp. Pseudoplazmodium nie wykazuje wrażliwości na działanie światła ani na różnice temperatury. Budowa wewnętrzna jest jednorodna, dopiero w przedniej części, na przestrzeni około 50 μ, myksameby są ściślej ułożone i wydłużone w kierunku poprzecznym. Część ta kieruje ruchem i budową sorokarpu. Po pewnym czasie pseudoplazmodium zatrzymuje się i poczyna się skupiać w mniej lub więcej zaokrągloną

* Termin stosowany w mykologii, oznacza wiązkę mniej lub bardziej ściśle połączonych trzonków konidialnych.

masę. Z niej wznosi się kilka wypukłości, z których każda da sorokarp wchodzący w skład koremium. Budowa trzonków rozpoczyna się od podłoża wewnątrz wzniesień i w miarę wydłużania się ich sorogen wznosi się w górę. Mimo że trzonki zakładają się oddzielnie, budują się



Rys. 9. *Dictyostelium polycephalum* Raper. a — tworzące się pseudoplazmodium, b — pseudoplazmodium wędrujące, c — budowa sorokarpu (wg Bonnera, The Cellular Slime Molds, str. 62, fig. 9, 1959)

z jednakową szybkością i na pewnej wysokości łączą się z sobą, tworząc silną podporę dla sorogenu. Po osiągnięciu 75-80% wysokości przyszłego sorokarpu, trzonki oddzielają się od siebie, jednocześnie sorogen ulega podziałowi, każda z jego części tworzy sorus na wierzchołku oddzielnego trzonka. Często w kulturach występują sorokarpy o pojedynczym trzonku, nie różniąc się wtedy od innych gatunków rodzaju *Dictyostelium*.

Myksameby, nie biorące udziału w budowie sorokarpu, przechodzą w stan spoczynku, pokrywając się sztywną błoną zawierającą celulozę. Mikrocysty, 4.0-6.5 μ średnicy, umieszczone w odpowiednie warunki,

przerastają, błona pęka, myksameby wydostają się i rozpoczynają nowy cykl rozwoju.

Mikrocysty *D. polycephalum* wysiane na pożywkę agarową z wyciągiem z siana albo 0,1% glikozy i 0,1% peptonu wraz z *Escherichia coli* przerastały, lecz myksameby rozmnażały się bardzo słabo i nie tworzyły sorokarpów, albo tylko bardzo mało. Rozwój takiej kultury był słaby w porównaniu z kulturą pierwotną w obecności różnych obcych organizmów. Wysianie mikrocyst w towarzystwie mieszaniny bakterii nie dało dobrego rezultatu, dopiero gdy kultura przypadkowo została zanieczyszczona grzybem *Dematium nigrum* pojawiły się liczne sorokarpy (Wittingham, Raper 1957). Można było przypuszczać, że grzyb produkuje jakieś substancje działające korzystnie, może pochłania szkodliwe produkty metabolizmu bakterii albo wywiera wpływ na fizyczne warunki kultury. To ostatnie przypuszczenie okazało się słuszne. Grzyb w jakiś sposób powoduje obniżenie wilgotności atmosfery w szalce. Gdy zamiast szklanej pokrywki szalki przykryto ją pokrywką z niepolewanej glinki, wilgotność powietrza w szalce obniżyła się do 40% nasycenia, a obecność grzyba stała się niepotrzebna; sorokarpy były obfite. Drugą funkcją grzyba było utrzymanie odpowiedniej kwasoty podłoża przez neutralizację kwaśnych i zasadowych produktów przemiany materii bakterii. Przy *pH* = 4,8 powstawały nienormalne pseudoplazmodia, nie tworzące sorokarpów. Obfite sorokarpy były przy *pH* = = 6,5-7,3, mała ilość była przy *pH* = 8,7, a przy *pH* = 9,1 nie następowało nawet skupianie się myksameb. Temperatura minimalna dla pełnego cyklu rozwoju wynosi 10-15°, optymalna 30°.

Wyhodowany ze ściółki leśnej ze stanów Ameryki Północnej: Michigan, Wisconsin, Illinois, Texas i Karolina Południowa (Raper 1956).

Dictyostelium mucoroides Brefeld

1869. *Abh. Senckenberg. Naturf. Ges.*, **7**; 85.

synonim: *Ceratiopodium elegans.* Sorokin. 1871

Mikołog. Oczerki **5**; 28.

Sorokarp bezbarwny, 2-10 mm wysoki, rzadko wyższy. Trzonek prosty, niekiedy posiada jedno albo dwa pseudorozgałęzienia, podobnie jak wierzchołek trzonka zakończone sorusem białawym, kulistym, 100-600 μ średnicy. Mikrocysty owalne, 2-4×4-7 μ.

Pseudoplazmodium *D. mucoroides* nie osięga kształtu określonego, gdy rozpoczyna się już budowa sorokarpu. W miarę dopływu strumieni myksameb, w centrum powstaje wzniesienie wydłużające się w postaci cylindra, w którym odbywa się formowanie trzonka. Pierwszym tego

objawem jest pojawienie się w jego wnętrzu błonki (Brefeld 1869), tworzącej rurkę obejmującą środkową część skupienia. Wewnątrz rurki myksameby, pęczniejąc, zwiększają swoją objętość, ulegają wakuolizacji, plazma wraz z jądrem zostaje zepchnięta na obwód komórek, które z kulistych stają się wskutek wzajemnego ucisku polyedryczne, znikają między nimi przestwory, w końcu pokrywają się błoną z celulozy — powstaje tkanka podobna do parenchymy roślin wyższych. Takim zmianom poprzedzanym przez powstawanie błonki, ulegają myksameby leżące coraz wyżej, trzonek wydłuża się stopniowo, sorogen odrywa się od podłoża. W okazach bardzo dorodnych dopływające strumienie myksameb wpełzają po gotowym trzonku w górę, niekiedy po spirali (Olive 1902). W końcu sorogen przyjmuje kształt wrzecionowaty, a następnie w miarę przekształcania się myksameb w mikrocysty, pod wpływem napięcia powierzchniowego, przybiera postać kulistą, często z drobną wypukłością, w której kończy się trzonek. Bonner (1959) uważa wspinanie się myksameb po trzonku za zjawisko równorzędne z wędrówką pseudoplazmodium *D. discoideum* po podłożu. Zachodzi jednak między tymi wędrówkami pewna różnica. W wędrującym pseudoplazmodium *D. discoideum* następuje już stopniowe różnicowanie się myksameb: podział na leżące w przedniej części, przeznaczone na budowę trzonka, i resztę, z której powstają mikrocysty. U *D. mucoroides* różnicowanie komórek odbywa się bezpośrednio przed włączeniem ich do rozszerzonego otworu rurki, koło którego widać tylko drobną ilość myksameb wydłużonych w kierunku osi trzonka (Bonner 1957) i zachowujących się inaczej względem barwników. U podstawy trzonek otoczony jest śluzem, w którym pogrążone są mniej lub więcej liczne zwakuolizowane komórki, i on jedynie przytwierdza sorokarp do podłoża.

Bez względu na rozmiary sorokarpu, zależnie od ilości wchodzących w jego skład myksameb, istnieją korelacje między średnicą sorusa i wysokością trzonka (1 : 8-10, Harper, 1926), a także między ilością rzędów komórek w trzonku, a więc grubością, a jego długością. Na podstawie bardzo licznych pomiarów Pfützner-Eckert (1950) stwierdziła istnienie w pewnych granicach stałego stosunku między grubością środkowej części trzonka a jego długością. Ilość rzędów komórek trzonka waha się od 1 do 6. Każdej ilości rzędów odpowiada określona grubość trzonka, a w pewnych granicach jego długość. Zmniejszenie albo zwiększenie ilości myksameb w okresie ich skupienia się nie wywiera wpływu na stosunek grubości trzonka do jego długości. Inny rezultat będzie, jeśli odcięcie części strumieni albo przeniesienie centrum skupiania nastąpi wtedy, gdy już rozpoczęła się budowa trzonka. Powstaje wtedy trzonek grubszy niż wynikałoby to z jego długości. Zwiększenie ilości myksameb w tym samym okresie powoduje wydłużanie się

trzonka ponad granicę określoną przez jego grubość, albo powstanie pseudorozgałęzienia. Wyniki tego rodzaju nasunęły przypuszczenie istnienia jakiegoś trudnego do wyjaśnienia wpływu masy myksameb, wchodzących w skład tworzącego się dopiero pseudoplazmodium, na kształt sorokarpu. Pomimo zachowania swej odrębności przypuszczalnie myksameby tworzą całość, decydującą o zachowaniu proporcji w budowie sorokarpu.

Niekiedy występują sorokarpy, których trzonki posiadają jedno, dwa, rzadko więcej pseudorozgałęzień, rozłożonych nieregularnie i zwykle niejednakowej długości. Powstają one z resztek strumieni wspinających się po gotowym trzonku, na którym tworzą drobne, osobne sorokarpy, połączone z nim tylko za pomocą śluzu.

Korelacje między częściami sorokarpu mogą ulegać zmianie pod wpływem czynników zewnętrznych; zwiększenie wilgotności atmosfery powoduje wydłużenie trzonka i zmniejszenie średnicy sorusa (Bonner, Adams 1958). Odwrotnie działa światło rozproszone — sorokarpy powstałe na świetle są niższe niż powstałe w ciemności.

Sorokarpy wznoszą się prostopadle do podłoża bez względu na jego położenie względem poziomu, co ma być objawem negatywnego hydrotropizmu i geotropizmu (Potts 1902, Harper 1926). Że oba te bodźce są przez *D. mucoroides* odbierane, dowodzi doświadczenie z hodowlą jego w kropli odwróconej ku dołowi. Początkowo sorokarp skierowuje się ku dołowi, wkrótce jednak wygina się, przyjmując położenie poziome. Harper podaje, że wygięcie następuje przez zwiększenie ilości komórek po stronie wypukłej trzonka albo przez ich klinowaty kształt.

Nie zawsze rozwój *D. mucoroides* przebiega normalnie. Znany jest wypadek (Schuckman 1924, 1925), że szczep dający normalne kultury w ciągu 4 miesięcy, nagle bez widocznej przyczyny przestał budować sorokarpy. Pomimo przeszczepiania go na różne pożywki w towarzystwie różnych bakterii stan ten trwał przez dwa lata. Powrót zdolności budowy sorokarpów nastąpił po przeszczepieniu go na niewyjałowiony nawóz koński, który jak uprzednio stwierdzono, nie był zakażony myksamebami *D. mucoroides*. Ten sam nawóz wyjałowiony nie wywarł żadnego wpływu.

Szczep *D. mucoroides*, niezdolny do tworzenia pseudoplazmodium, hodowała w ciągu 12 miesięcy, przeszczepiając go co tydzień, Pfütznер-Eckert (1950). Myksameby żyły w rozproszeniu, co najwyżej tworzyły krótkie strumienie albo drobne skupienia. Umieszczenie w kulturze tego mutanta pseudoplazmodium normalnego szczepu powodowało skupianie się myksameb; powstawało duże skupienie, które po pewnym czasie uległo autolizie. Tylko w dwóch wypadkach, na wierzchołku takiego skupienia powstały drobne sorokarpy, prawdopodobnie zbudo-

wane tylko z myksameb przeniesionego wierzchołka. Jednoczesne szczepienie myksameb mutanta z mikrocystami albo myksamebami typu dzikiego nie dało rezultatu: rozwijały się tylko myksameby, dalszego rozwoju nie było. Gdy w kulturze mutanta zabrakło bakterii, myksameby przekształcały się w silnie łamiące światło mikrocysty, które przeniesione w odpowiednie warunki przerastały. Podobnego mutanta, którego rozwój zatrzymał się na stadium wegetatywnym, otrzymał Filoza (wg Bonner 1959), szczepiąc pojedyncze mikrocysty *D. mucoroides* pochodzące z jednego sorusa. Ze 100 kultur pochodzących od pojedynczych mikrocyst 87 dało normalne sorokarpy, rozwój 12 nie był normalny. Powstawały w nich pseudoplazmodia wędrujące, lecz nieforemne, rozpadające się łatwo i budujące sorokarpy niekształtne. Jedna mikrocysta dała kulturę, w której rozwój zatrzymał się na stadium wegetatywnym.

Dictyostelium sphaerocephalum (Oud.) Olive

1902. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.* **30**: 505.

Hyalostilbum sphaerocephalum Oudmans

1885. *Aan. Myc. Nederl.* **9-10**: 39.

Sorokarp 2-15 mm wysoki, młody sorus biały, starszy staje się żółtawy albo zielonkawy, mikrocysty owalne, rzadko kuliste, 3-5×5-10 μ. Cechą, różniącą go od *D. mucoroides*, mają być mikrocysty dwa razy dłuższe niż ich średnica.

Pospolity na odchodach: szczurów, ptaków, ropuch, żółwi, saren. Spotykany w Holandii, Belgii, Liberii i Ameryce Północnej.

Dictyostelium giganteum Singh

1947 *J. Gen. Microbiol.*, **1**: 18.

Sorokarp biały, 17-30 mm wysoki, trzonek w górnej części falisto wygięty, czasem z jednym lub większą ilością, różnej długości pseudorozgałęzień. Sorus kulisty, czasem owalny, mlecznobiały, mikrocysty eliptyczne, 2-3,5×5-10 μ. Z powodu swych rozmiarów przeważnie leżący.

Notowany z Anglii, izolowany z kompostu i ze szlamu.

Dictyostelium brevicaule Olive

1902. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, **30**: 506.

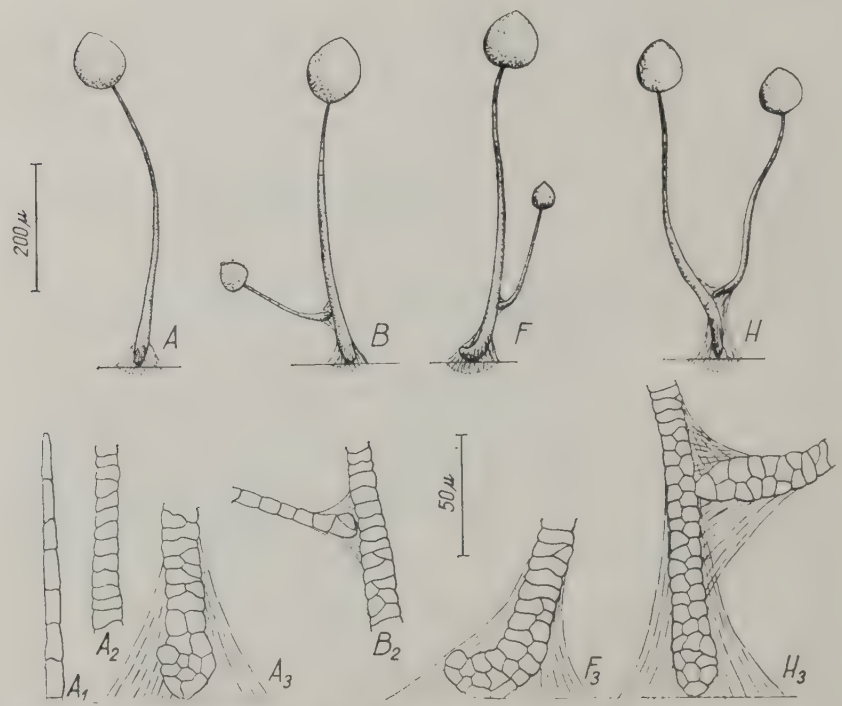
Sorokarp 1-3 mm wysoki, sorus biały, mikrocysty 3-4×4-7 μ rzadziej kuliste, 3-4 μ średnicy.

Od małych okazów *D. mucoroides* różni się stosunkowo grubym trzonkiem. Jest to cecha stała, która nie uległa zmianie w ciągu czteroletniej hodowli. Wyhodowany z odchodów owcy i kozy (O l i v e *l. c.*).

Dictyostelium minutum R a p e r

1941. *Mycologia* **33**: 633.

Sorokarp, 500-800 μ wysoki, sorus biały, niezupełnie foremny, 75-125 μ średnicy, rzadko nieco większy. Trzonek bezbarwny albo szarobiały, u podstawy 12-18 μ średnicy, dalej zbudowany z 2-4 rzędów komórek, a pod sorusem tylko z jednego, 2-6 μ średnicy. Częściej niż u innych gatunków rodzaju *Dictyostelium* występują pseudorozgałęzienia. Mikrocysty eliptyczne, 3.0-3.5×5.7 μ, zdarzają się pojedyncze kuliste (rys. 10).



Rys. 10. *Dictyostelium minutum* R a p e r. A. B. F. H — sorokarpy, A_1, A_2, A_3, F_3 — budowa trzonka na rożnej jego wysokości, B_2, H_3 — pseudorozgałęzienia (wg R a p e r a, *Mycologia*, **33**, 1941)

Rozwija się dobrze na pożywce agarowej z wyciągiem z siana z dodatkiem 0,05-0,1% peptonu, albo bez niego, zneutralizowanej do $pH=6$. Spomiędzy różnych próbowanych bakterii, najodpowiedniejszą była *Escherichia coli*, jej kolonie były całkowicie pochłaniane, gdy innych bakterii tylko częściowo. W okresie agregacji myksameby wydłużają się bardzo znacznie (7-8×18-24 μ), układają się w szerokie nieforemne płaty przechodzące w mniej lub bardziej wyraźne strumienie, dążące do centrum. Pseudoplazmodia drobne, nie przekraczają 1,5 mm. Powstające sorokarpy nie wykazują wrażliwości na światło, nie reagują na jednostronne oświetlenie.

Wyhodowany ze ściółki leśnej w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej: Virginia, Massachusetts, Maryland.

Dictyostelium lacteum van Tieghem

1880. *Bull. Soc. Bot. France* **27**: 317.

Mlecznobiały sorus otacza wierzchołek trzonka, złożonego tylko z jednego rzędu komórek. Mikrocysty kuliste, 2-5 μ średnicy.

Znany tylko z Francji i Ameryki Północnej.

Dictyostelium purpureum Olive

1902. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, **30**: 507.

Sorokarp purpurowy albo fioletowy, czasem prawie czarny, mikrocysty owalne, 3-5×5-8 μ, czasem nierównoboczne.

W kulturach, poddanych działaniu fenolu, m-krezolu, p-krezolu i rezorcinolu przez dodanie tych związków do pożywki, powstają sorokarpy pozbawione barwnika. W ten sam sposób reaguje na obecność tych związków *Polysphondylium violaceum* (Whittingham, Raper 1956).

Dictyostelium roseum van Tieghem

1880. *Bull. Soc. Bot. France* **27**: 317.

Sorus zabarwiony jaskraworóżowo, mikrocysty owalne, 4×8 μ. Notowany z Francji, gdzie został znaleziony na odchodach różnych zwierząt, najczęściej królika.

Dictyostelium aureum Olive

1902. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, **30**: 507.

Sorokarp 1,5-4 mm wysoki, sorus jasno- albo złotożółty, mikrocysty owalne, czasem nierównoboczne, 2,5-3,0×5,0-8,0 μ.

Rozwija się bardzo powoli na wyciągu z nawozu końskiego i na innych pożywkach ogólnie stosowanych. Myksameby posiadają pseudopo-

dia szerokie, płatowate, wyglądają podobnie do myksameb innych gatunków, znajdujących się w warunkach nienormalnych, niedostatecznej wilgotności (O l i v e *l. c.*).

Rodzaj *Polysphondylium* B r e f e l d

1884. *Untersuch. Gesam. Mykol.* Heft 6: 1.

Sorokarp złożony z trzonka, noszącego na sobie pseudorozgałęzienia ustawione w okółki, i sorusu obejmującego jego wierzchołek, złożonego z mikrocyst. Podobne, mniejsze sorusy znajdują się na drobnych sorokarpach tworzących rozgałęzienia. Czasem występują sorokarpy o trzonku prostym.

Polysphondylium violaceum B r e f e l d

1884. *Untersuch. Gesam. Mykol.* Heft 6: 1.

Sorokarp 5-20 mm wysoki, mniej lub bardziej intensywnie zabarwiony fioletowo. Na trzonku ilość okółków, złożonych z 2-6 drobnych sorokarpów, różna; rzadko trzonki proste. Sorusy, 50-300 μ średnicy, złożone z wydłużonych, owalnych mikrocyst, 2,5-5×6-8 μ.

Tworzenie sorokarpu rozpoczyna się wcześnie; nim jeszcze skończy się formowanie zaokrąglonego pseudoplazmodium, już w jego centrum powstaje wzniesienie wydłużające się stopniowo w utwór cylindryczny, wewnątrz którego, począwszy od podłoża, postępuje budowa trzonka, przebiegająca tak samo jak u *D. mucoroides*. Gdy zbiegną się już strumienie myksameb, a trzonek dostatecznie się wydłuży, sorogen odrywa się od podłoża i zostaje unoszony w górę w postaci wydłużonej elipsoidy. W pewnej odległości od podłoża stanowiącej połowę wysokości całego sorokarpu (H a r p e r 1929), następuje w dolnej części sorogenu przewężenie i część jego zostaje na miejscu, a po zaokrągleniu dzieli się na części mniej więcej równe, z których każda buduje drobny sorokarp. W ten sposób powstaje okółek, połączony z trzonkiem tylko za pomocą śluzu. Dzielenie się sorogenu powtarza się, zależnie od jego rozmiarów, nawet kilkanaście razy, dając za każdym razem nowy okółek. Ten sposób budowy sorokarpu związany jest z zachowaniem przez myksameby charakteru komórek embrionalnych. Przekształcanie się ich w komórki trzonka i mikrocysty odbywa się szybko, bez wstępnego przygotowania, jakie odbywa się w wędrującym pseudoplazmodium *D. discoideum*.

Rozmiary sorokarpów, ilość okółków na trzonku, odległość między nimi, a także liczba sorokarpów w okółkach, do pewnego stopnia zależne są od warunków zewnętrznych: wilgotności podłoża i atmosfery, a także od światła. Pierwszy z tych czynników sprzyja wydłużaniu się trzonka, przesunięciu się okółków rozgałęzień ku jego górnej części i pojawieniu

się nieregularnie rozrzuconych, pojedynczych gałązek różnej długości (Bonner, Shaw 1957).

W jednakowo bogatych kulturach, trzymanych w okresie morfogenetycznym, jedne w ciemności, drugie na świetle zmiennym rozproszonym dnia i nocy, ilość sorokarpów była różna (Harper 1929, 1932). Na świetle sorokarpy były liczniejsze lecz mniejsze, występowały w większej ilości sorokarpy o trzonkach pozbawionych pseudorozgałęzień. W ciemności sorokarpy były mniej liczne, lecz większe, o większej ilości okółków.

Znajdowany często w glebach i ściółce leśnej w Europie i Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej.

Polysphondylium pallidum Olive

1902. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, **30**: 508.

Sorokarp biały, sorusy, 50-80 μ średnicy, złożone z mikrocyst 2,5-3,5 × ×5,0-6,5 μ, czasem część mikrocyst kulista, 7-8 μ średnicy. Ilość okółków, jak i w nich drobnych sorokarpów, różna; czasami pseudorozgałęzienia są różnej długości i częściowo nieregularnie rozrzucone. Całość znacznie wątlejsza od *P. violaceum*.

Polysphondylium album Olive

1902. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, **30**: 509.

Sorokarp biały, sorusy 100-200 μ średnicy, trzonek bardzo cienki, pokładający się, w okółkach liczniejsze sorokarpy niż u innych gatunków rodzaju *Polysphondylium*. Mikrocysty owalne 2,5-3,0×4,0-5,6 μ.

Znaleziony na odchodach ropuchy z Florydy.

Niektóre gatunki z rodzaju *Dictyostelium* jak: *D. sphaerocephalum*. Olive, *D. giganteum* Singh, następnie *D. brevicaule* Olive i *D. minutum* Raper, a także *D. roseum* van Tieghem, *D. aureum* Olive, a z rodzaju *Polypsondylium P. album* Olive nasuwają pewne wątpliwości, czy wszystkie z nich są istotnie samodzielnymi gatunkami.

Rodzaj *Coenonia* van Tieghem

1884. *Bull. Soc. Bot. France*, **31**: 303.

Wierzchołek trzonka uformowany w kształcie czarki, wewnątrz której znajduje się skupienie mikrocyst. Jeden gatunek.

Coenonia denticulata van Tieghem

1884. *Bull. Soc. Bot. France* **31**: 303.

Sorokarp składa się z trzonka, 2-3 mm długiego, osadzonego na rozgałęzionej płytce, a kończącego się rodzajem czarki, o brzegach wyciągniętych w ząbki. Wewnątrz niej znajduje się sorus w postaci żółtej

masy. Mikrocysty kuliste, 6-8 μ średnicy, pokryte są żółtą celulozową błoną i bezbarwną galaretowatą otoczką.

Van Tieghem obserwował rozwój *C. denticulata* na szkiełku w kropli świeżego albo rozkładającego się moczu. Myksameby tworzą skupienia, a leżące w nich na spodzie osobniki pęczniejąc powiększają swoją objętość, wskutek wzajemnego ucisku stają się polyedryczne i w końcu pokrywają się błoną z celulozy. W ten sposób powstaje płytka, od której promieniują w różnych kierunkach rozgałęzienia. Na płytce wznosi się skupienie stożkowate o tępym wierzchołku; w jego osi myksameby zwiększają swoją objętość i pokrywają się błoną z celulozy, tworząc trzonek wydłużający się przez nakładanie od wierzchołka nowych komórek. Gdy trzonek osiągnie odpowiednią wysokość, myksameby skupiają się na jego wierzchołku w postaci kuli. Komórki leżące w jej dolnej części powiększają się i okrywają błoną, przy czym leżące na brzegu wydłużają się w postaci ząbków, otaczających pozostałą część masy myksameb przekształcających się w mikrocysty. Komórki tworzące ząbki posiadają wyrostki wrastające w masę mikrocyst. Podobne wyrostki zwrócone ku górze posiadają komórki trzonka.

Wszystkie sorokarpy powstałe w kropli na szkiełku miały trzonki proste, powstałe na łupinie bobu, wystającego z wody, były rozgałęzione. W połowie wysokości powstawał okółek trzech drobnych sorokarpów.

Gatunek ten został znaleziony na nasionach bobu, leżącego przez długi czas w szklance z wodą i wynurzonych wskutek jej wyparowania. Dotychczas nie został ponownie odnaleziony.

Rodzina *Acytosteliaceae*

Sorokarpy składają się z pojedynczej mikrocysty albo z sorusa, osadzonych na bezkomórkowym trzonku.

Rodzaj *Protostelium* Olive L. S. *et* Stoianovitch

1960. *Bull. Torrey Botan. Club,* **87**: 12.

Myksameby tworzą pseudopodia nitkowate, czasem rozgałęzione, nie skupiają się w pseudoplazmodium, przekształcają się w dwojakie mikrocysty: leżące na podłożu i wznoszące się na bezkomórkowym trzonku.

Protostelium mycophaga Olive L. S. *et* Stoianovitch

1960. *Bull. Torrey Botan. Club,* **87**: 12.

Myksameby o cytoplazmie zabarwionej pomarańczowo posiadają jedno jądro i jedną wodniczkę tętniącą. Mikrocysty o rozmiarach 9-27 × × 9-30,5 μ leżą na podłożu; mniejsze, 4,1-11,6 μ średnicy, wznoszą się na

wytworzonym przez siebie bezkomórkowym trzonku, do 70 μ wysokim, u podstawy około 1 μ, a na wierzchołku, pod mikrocystą, 0.5 μ grubym.

P. mycophaga otrzymano w kulturze pochodzącej z owocostanu *Phragmites communis*, obok *Rhodotorula mucilaginosa* i *Phoma*. Komórki pierwszego i konidia drugiego stanowią jego pokarm. Rozwija się także dobrze w towarzystwie *Ustilago violacea*, *Sporobolomyces sp.* i *Sporodiobolus sp.*; nie korzysta z *Saccharomyces cerevisieae* i niektórych innych drożdży, jak również z bakterii.

W młodych kulturach myksameby trzymają się ściśle z kolonią grzybów: gdy ją wyczerpią rozchodzą się po powierzchni płytki, tworząc mikrocysty leżące i na trzonkach. Mikrocysty pokryte są delikatną błonką, nie dającą reakcji na celulozę, jednakże podwójna ściana mikrocyst dwutygodniowych barwi się pod wpływem chlorku cynku z jodem. Często występują mikrocysty złożone z dwu komórek: gdy są one jednakowe, mogą być rezultatem podziału myksameby już w obrębie błony; gdy się różnią rozmiarami i gęstością protoplastu — trzeba przyjąć, że dwie sąsiednie myksameby pokryły się wspólną błoną. Mikrocysty przerastając pozostawiają pustą błonkę, albo resorbując błonę przekształcają się w myksamebę. Przeobrażenie się myksameby w sorokarp na trzonku następuje bardzo szybko, w ciągu 7-16 minut. Prawdopodobnie pierwszym stadium jest pokrycie się myksameby błonką: wskazują na to błonki, leżące wokół podstawy trzonków. Mikrocysty posiadają pewną lepkość: gdy stoją blisko siebie, często zlepiają się z sobą, ale trzonki pozostają wolne. Mikrocysta pochodząca z trzonka, przerastając, nie pozostawia błonki, albo pozostawia bardzo delikatną, nie dającą wyraźnej reakcji na celulozę.

P. mycophaga rozwija się jednakowo dobrze w ciemności i na świetle; na jednostronne oświetlenie nie reaguje. Kultura trzymana przez miesiąc w temperaturze 8° zginęła.

Zaliczenie *Protostelium cytophaga* do rzędu *Acrasiales* Olive i Stoianovitch uzasadniają występowaniem w błonkach celulozy, tworzeniem trzonka podobnego do trzonka występującego w rodzaju *Acytostelium*, a także tworzeniem przez myksameby nitkowatych pseudopodiów. Proponują połączenie rodzaju *Acytostelium* i rodzaju *Protostelium* w jedną rodzinę *Acytosteliaceae*.

Rodzaj *Acytostelium* Raper

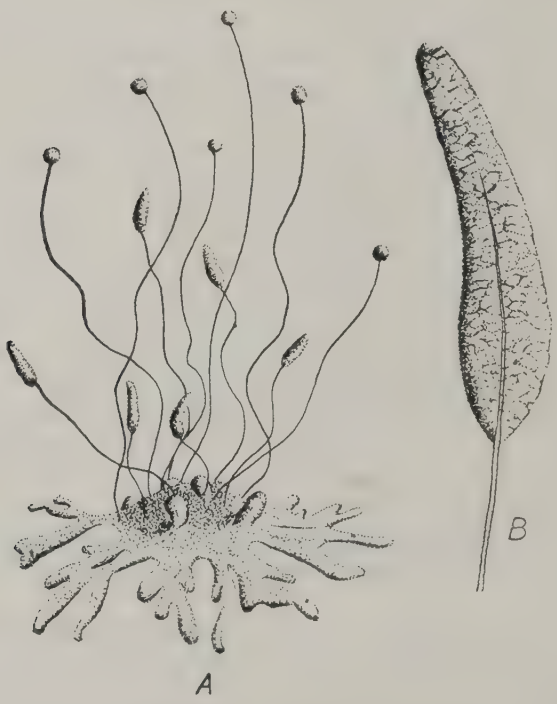
1956. *Mycologia*, **48**: 169.

Sorokarpy składają się z sorusa i trzonka w postaci rurki, nie podzielonej na komórki. Jeden gatunek.

Acytostelium leptosomum Raper

1956. *Mycologia*, 48: 169.

Sorokarpy, występujące gromadnie, składają się z sorusa 30-50 μ średnicy, złożonego z zarodników kulistych, 4,5-7,5 μ średnicy, (najczęściej 5-6,5 μ); sorus osadzony na prostym bezkomórkowym trzonku, 750-1500 μ długim, 1-2 μ średnicy, przylegającym rozpłaszczeniem do podłoża (rys. 11).



Rys. 11. *Acytostelium leptosomum* Raper. A — pseudoplazmodium i tworzące się sorokarpy, B — podnoszący się sorogen (wg Bonnera, The Cellular Slime Molds, str. 69, fig. 10, 1959)

Nim jeszcze skończy się skupianie myksameb, już w pobliżu centrum rozpoczyna się powstawanie sorokarpów. W różnych miejscach pseudoplazmodium pojawiają się wyrostki o wierzchołkach zaokrąglonych, złożone ze ściśle ułożonych myksameb, wydłużonych w kierunku prostopadłym do osi wyrostka. Wewnątrz niego powstaje trzonek, będący rurką

z wydzielonej przez myksameby błony, zawierającej celulozę. Przypuszczalnie wydzielanie błony następuje do wnętrza bardzo wąskiej szpary, znajdującej się wewnątrz masy myksameb. Wyrostek wydłuża się, lecz szybciej od niego wydłuża się trzonek, tak że w końcu sorogen odrywa się od podłoża i jest przez trzonek unoszony ku górze. Początkowo sorogen posiada kształt soczewkowaty, który stopniowo przechodzi w kulisty, a wtedy myksameby w sposób gwałtowny przekształcają się w mikrocysty. Jakie siły działają przy podnoszeniu się sorogenu, trudno wyjaśnić, prawdopodobnie głównie czynne są: siła kohezji i napięcie powierzchniowe.

Dla hodowli *A. leptosomum* najodpowiedniejsza okazała się pożywka złożona z 0,5% glikozy i 0,1% peptonu (Raper, Quinlan 1958). Najczęściej hodowano go w towarzystwie *Escherichia coli* lub *Aerobacter aerogenes*; mógł jednak korzystać także z innych bakterii.

Rozwój może się odbywać w szerokich granicach *pH* podłoża (4,5-7,5) najodpowiedniejsza kwasota: *pH* — 4,8-6,8. Optymalna temperatura wynosi 25°, przy 15° tworzą się tylko nieliczne pseudoplazmodia, bardzo drobne sorokarpy i mikrocysty. W temperaturze 30° rozwoju nie ma. Nawet w kulturach rozwijających się normalnie występują mniej lub więcej liczne pojedyncze mikrocysty; w warunkach niezupełnie sprzyjających wszystkie myksameby przechodzą w stan spoczynku, pokrywając się błoną zawierającą celulozę. Barwi się ona pod działaniem chlorku cynku i płynu Lugola, a w świetle spolaryzowanym wykazuje podwójne załamanie, lecz mniej wyraźne niż błona mikrocyst znajdujących się w sorusie.

Wyhodowany ze ściółki leśnej w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej.

METODY WYOSOBNIENIA I HODOWLI GATUNKÓW Z RODZINY *DICTYOSTELIACEAE*

Sorokarpy rodzajów z rodziny *Dictyosteliaceae* są zbyt delikatne, aby mogły się ostać czas dłuższy na stanowiskach naturalnych w przyrodzie, należy więc poszukiwać ich w sztucznych kulturach. Początkowo znajdowano je w kulturach przeważnie na odchodach zwierzęcych obok grzybów, toteż traktowano je jako organizmy koprofilne. Z czasem okazało się, że na nawozy dostają się one z gleby albo ze ściółki leśnej, a że stwierdzono pewien związek między własnościami gleby a występowaniem w niej różnych gatunków, należało uznać je za stałych mieszkańców tych środowisk.

W celu wyłowienia tych organizmów z ich naturalnych podłoży stosuje się różne metody. Po raz pierwszy otrzymano *D. mucoroides*, *P. violaceum* i *P. pallidum* ze ściółki leśnej i gleby torfowej na rozłożonych

na nich wyjałowionych odchodach królika (Krzemieniewscy 1927), następnie stosowano metodę Winogradskiego rozkładania drobnych grudek ziemi na pożywki agarowe różnego składu. Bardzo dowcipną metodę zastosował Singh (1947). Na powierzchni 1,5% agaru głodowego, tj. agaru mytego z dodatkiem 0,5% NaCl, albo bez niego, o $pH = 6{,}5$-$6{,}8$, rozmieszczał w postaci pierścieni gęstą zawiesinę bakterii. Wewnątrz każdego pierścienia kładł grudkę ziemi. W tych warunkach mogły się rozwijać tylko organizmy żywiące się bakteriami.

Dobry rezultat daje zakażanie płytek agarowych z pożywką, wodą wytrząsaną z glebą lub ściółką. Po odstaniu większych cząstek jeszcze zmętniałą wodą zlewa się płytkę, po opadnięciu drobnych cząstek wodę się odlewa (Raper 1940). Cohen (1953) używał płytek agarowych zawierających mannitol, na które nakładał wyjałowione na sucho odchody królika. Na tak przygotowaną płytkę nalewał 3 ml zawiesiny odtrzymanej przez wytrząsanie badanego materiału z wodą.

Schuckman (1925) otrzymywał kultury *D. mucoroides* bezpośrednio z odchodów królika, świnki morskiej i stwierdził obecność myksameb w przewodzie pokarmowym tych zwierząt. W przewodach pokarmowych innych zwierząt, jak: konia, osła, świni, psa i szczura myksameb nie było. Z kultur pierwotnych, zwykle zanieczyszczonych różnymi mikroorganizmami, przenosi się mikrocysty na pożywki zestalone agarem (1,5-2%). Potts (1902) hodował *D. mucoroides* w pożywce płynnej, w której otrzymywał skupienia mikrocyst na dnie probówki. Bonner (1959) odnosi się do tych danych sceptycznie, przypuszczając że nie były to mikrocysty, lecz może makrocysty pojawiające się czasem u tego gatunku.

Skład pożywek zestalonych agarem musi przede wszystkim sprzyjać rozwojowi odpowiednich bakterii, który jednak nie może być zbyt silny, aby nie zagłuszał rozwoju myksameb. Drugim warunkiem jest stosunek węglowodanów do związków azotowych w pożywce. Produkty przemiany materii bakterii nie są obojętne dla myksameb. Przy nieodpowiednim stosunku węgla do azotu może nastąpić wydzielanie amoniaku, który zależnie od ilości hamuje całkowicie rozwój myksameb albo powoduje powstawanie sorokarpów zniekształconych, przypominające niższe formy *Acrasieae* (Cohen 1953).

Do hodowli stosowano bardzo różne pożywki, przede wszystkim wyciągi z nawozu, przeważnie końskiego i króliczego, z ziemniaka, z zielonego grochu, marchwi, siana (szczególnie przydatnego do kultur z *Serratia marcescens*), brzeczki piwnej z dodatkiem 0,05-0,5% peptonu. Wyciągi przygotowywano przez gotowanie różnych ilości materiału z wodą, np. 100 g świeżego nawozu końskiego w litrze wody po wyjałowianiu w ciągu 20 minut pod ciśnieniem, a po dodaniu agaru wyjałowiano powtórnie (Blaskowitz, Raper 1957). Na wyciąg z marchwi podaje Ra-

per (1940b) receptę: 300 g świeżej marchwi w litrze wody gotuje się przez godzinę, sączy i dopełnia do litra. Brzeczkę piwną stosowali Michalska i Skupieński (1938), 2% była najodpowiedniejsza dla rozwoju *P. pallidum*, 8% — dla *P. violaceum*, a bardziej jeszcze skoncentrowana — dla *D. mucoroides*.

Raper wprowadził prostsze pożywki, dodając do 1,5-2% agaru tylko jakiś cukier i pepton w jednakowych ilościach, 0.05-1,2%. W razie potrzeby, dla otrzymania odpowiedniej kwasoty (około $pH = 7$), do zbuforowania używał fosforanów. Przy stosowaniu prostych pożywek Rapera (1939) wybór cukru zależny jest od gatunku bakterii, z jakim mają być hodowane myksameby. Np. *Pseudomonas fluorescens* nie korzysta z laktozy i sacharozy, *Escherichia coli* z sacharozy, a *Escherichia communior* fermentuje wszystkie trzy cukry. Zbyt silna fermentacja cukru może powodować spadek *pH* poniżej 4.0-4.2, do granicy, przy której rozwijają się jeszcze myksameby *D. discoideum*, ale nie budują sorokarpów. Z drugiej strony rozkład peptonu może spowodować zalkalizowanie pożywki, które również działa szkodliwie. Czasem korzystna jest obecność grzyba, np. w pożywce z sacharozą i bakteriami z niej nie korzystającymi, wysianie grzyba fermentującego ją umożliwia rozwój *Dictyostelium*. Poza peptonem dobrym źródłem azotu są sole amonowe i asparagina w połączeniu z odpowiednim cukrem.

Bardziej niż myksameby wrażliwy na warunki zewnętrzne jest proces budowy sorokarpu. Przy optymalnych warunkach kolonie bakterii są całkowicie pochłonięte, przy mniej korzystnych część kolonii nie zostaje zużyta, powstają sorokarpy niezupełnie foremne, część myksameb ginie albo ulega ocystowaniu.

Niektórzy badacze dawali pierwszeństwo pożywce Bonnera (1947) o następującym składzie: na 1000 ml wody destylowanej daje się 10 g peptonu, 10 g glikozy, 0.96 g fosforanu dwusodowego, 1.45 g fosforanu jednosodowego i 20 g agaru.

Bradley i Sussman (1952) podali pożywkę, na której można utrzymać czystą kulturę myksameb, chociaż rozwój w niej jest słabszy niż w obecności bakterii. Skład jej: na 1000 ml wody destylowanej, 2.5 g ekstraktu drożdżowego, 2.0 g ekstraktu z mięsa, 4 g glikozy, 2 g fosforanu potasowego, 0,5 g siarczanu magnezu, 0,1 g lecytyny. Ekstrakt drożdżowy można zastąpić mieszaniną witamin: ryboflawina 500 μg, po 200 μg, tiamina, amid kwasu nikotynowego, kwas pantotenowy, pirydoksyna, kwas aminobenzoesowy, 50 μg kwas foliowy, po 0,1 μg biotyna i B_{12}. Ekstrakt mięsny można zastąpić mieszaniną puryn i pirymidyn.

Płytki agarowe można zakazić w dwojaki sposób (Raper 1940): zalewając płytkę zawiesiną mikrocyst i bakterii, albo szczepiąc bakteriami płytkę o dwa dni wcześniej.

Korzystając z tego, że myksameby w okresie morfogenetycznym nie pobierają pokarmu, badacze amerykańscy przeprowadzali obserwacje, przeważnie nad rozwojem *D. discoideum*, na materiale oczyszczonym z bakterii. Z kultury znajdującej się w okresie agregacji spłukiwano myksameby i otrzymaną zawiesinę parokrotnie odwirowywano. Tak oczyszczony materiał umieszczano na płytce agaru głodowego, tj. agaru poddanego kilkodniowej fermentacji z dodatkiem lub bez 0,5% NaCl, albo wprost na wilgotne szkiełko.

Mikrocysty wszystkich gatunków rodziny *Dictyosteliaceae* są mało odporne na wysuszenie, w krótkim czasie tracą zdolność przerastania. Trzeba było szukać sposobu utrzymywania ich przy życiu przez czas dłuższy. Można kultury gatunków rodziny *Dictyosteliaceae* zachować żywe przez czas nieograniczony (Raper 1951). umieszczając je w temperaturze 2-6°, przeszczepiając co trzy miesiące i chroniąc przed brakiem bakterii. Raper podaje także, że Bonner (wiadomość niepublikowana) kultury na skośnym agarze w probówkach pokrywał wyjałowionym ciężkim olejem mineralnym. Tą metodą utrzymywał przy życiu różne gatunki przez 10 miesięcy, a niektóre kultury nawet dłużej, do 30 miesięcy. Najodpowiedniejsza jednak okazała się metoda liofilizacji, zastosowana przez Rapera i Alexandra (1945), polegająca na wyparowaniu w próżni wody z zamrożonego materiału. Próby przechowania w ten sposób myksameb zawiodły, ale mikrocysty *D. discoideum* i *P. violaceum* zachowały zdolność przerastania 106 i 105 miesięcy.

O życiu mikroorganizmów z grupy *Acrasieae* w warunkach naturalnych nic nie wiadomo, rola ich w przyrodzie jest przypuszczalnie taka sama jak innych *Protozoa*. Przyczyniają się do utrzymania w glebie równowagi biologicznej, nie dopuszczając do nadmiernego rozmnażania się bakterii. Hipoteza ta znajduje pewne poparcie w doświadczeniach (Singh 1947) z wyjałowioną glebą, szczepioną następnie określoną ilością bakterii i mikrocyst *D. mucoroides* albo *D. giganteum*. Co jakiś czas oznaczano ilość bakterii. W glebie szczepionej mieszaniną bakterii i mikrocyst *D. mucoroides* albo *D. giganteum* bakterii było mniej niż w glebie szczepionej tylko bakteriami, przy czym *D. mucoroides* było bardziej aktywne niż *D. giganteum*.

ROZMIESZCZENIE GEOGRAFICZNE

Wiadomości o rozmieszczeniu geograficznym mikroorganizmów z grupy *Acrasieae* są bardzo skąpe. Dotychczas wiadomo tylko, że znajdują się one w ściółkach leśnych i glebach Europy i Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej.

Na podstawie pojawiania się różnych gatunków na przygodnych podłożach stwierdzono obecność *Dictyostelium mucoroides* Brefeld (1869)

i *Guttulina protea* Fayod (1883) w Niemczech, *Polysphondylium violaceum* Brefeld (1884) we Włoszech. Z Francji van Tieghem (1880, 1884) podaje: *Guttulina aurea, G. sessilis, Dictyostelium lacteum, D. roseum* i dwa nowe rodzaje *Acrasis* i *Coenonia. D. mucoroides* notuje Skupieński (1918). Z Rosji podał Cienkowski (1873) *Guttulina rosea*, a Sorokin (1871) *Dictyostelium mucoroides*. Z Holandii, Belgii jak również ze Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej Oudmans (1885) opisał *Dictyostelium sphaerocephalum*. Olive (1901) obok znanych *D. mucoroides* i *Polysphondylium violaceum* podaje z Ameryki nowe gatunki: *Guttulinopsis vulgaris, G. stipitata, G. clavata, Dictyostelium brevicaule, D. purpureum, Polysphondylium pallidum* i *P. album*.

Metody poszukiwania *Acrasieae* w glebie i ściółce leśnej okazały się dogodniejsze: łatwiej można otrzymać kultury przynajmniej bardziej rozpowszechnionych gatunków, co pozwala określić warunki, w jakich różne gatunki żyją w przyrodzie.

W Polsce stwierdzono (Krzemieniewscy 1927, Krzemieniewska 1934) obecność *D. mucoroides* w ściółce lasów liściastych i iglastych, w glebach łąkowych i uprawnych. W tych samych warunkach, lecz o wiele rzadziej, spotyka się *P. violaceum*; *P. pallidum* związane jest z torfowiskami wyżynnymi i glebą leśną o odczynie poniżej *pH*=7.

Z gleb różnych okolic Anglii, a przede wszystkim z gleb poletek stacji rolniczej w Rothamsted, nienawożonych i nawożonych tak mineralnymi, jak organicznymi nawozami, Singh (1947) wyhodował *D. mucoroides* i nowy gatunek *D. giganteum*.

W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej obok gatunków znanych w Europie ze ściółki leśnej wyosobnili: Raper nowe gatunki: *D. discoideum* (1935), *D. polycephalum* (1956) *D. minutum* (1941) i nowy rodzaj *Acytostelium* (1956); Olive i Stoianovitch nowy gatunek *Acrasis rosea* i nowy rodzaj *Protostelium* (1960).

Panu Prof. Drowi W. Kunickiemu-Goldfinger za użyczenie mi z prywatnego księgozbioru części potrzebnej literatury i Panu J. K. Łukaszewiczowi za wykonanie kopii rysunków składam serdeczne podziękowanie.

LITERATURA

Arndt, A., 1937: Rhizopodienstudien. III. Untersuchungen über *Dictyostelium mucoroides* Brefeld. *Roux Arch. Etnwicklungsmech. Organ.* **136**: 681.

de Bary, A., 1884: Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze. Mycetozoen u. Bakterien., Leipzig.

Blaskovič, J. C., Raper, K. B., 1957. Encystment stages of *Dictyostelium*. *Biol. Bull.*, **113**: 58.

Bonner, J. T., 1944: A descriptive study of the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Amer. J. Botan.*, **31**: 175.

Bonner, J. T., 1947: Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.*, **106**: 1.

Bonner, J. T., 1949: The demonstration of acrasin in the later stages of the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.*, **110**: 259.

Bonner, J. T., 1950: Observations on the polarity in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biol. Bull.*, **99**: 143.

Bonner, J. T., 1952: The pattern of the differentiation in amoeboid slime molds. *Amer. Naturalist*, **86**: 79.

Bonner, J. T., 1957: A theory of the control of differentiation in the cellular slime molds. *Quart. Rev. Biol.*, **32**: 232.

Bonner, J. T., 1959a: Evidence for the sorting in the development of the cellular slime molds. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **45**: 379.

Bonner, J. T., 1959b: The cellular slime molds. Princeton, New Jersey, Princeton University Press.

Bonner, J. T., Eldredge, D. Jr., 1945: A note on the rate of morphogenetic movement in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Growth*, **9**: 287.

Bonner, J. T., Slifkin, T. M., 1949: A study of the control of the differentiation: the proportion of stalk and spore cells in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Amer. J. Botan.*, **36**: 727.

Bonner, J. T., Clark, W. W., Neely, C. L., Slifkin, M. K., 1950: The orientation to light and the extremely sensitive orientation to temperature gradients in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **36**: 149.

Bonner, J. T., Frascella, E. B., 1952: Mitotic activity in relation to differentiation in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.*, **121**: 561.

Bonner, J. T., Frascella, E. B., 1953: Variations in cell size during the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biol. Bull.*, **104**: 297.

Bonner, J. T., Koontz, P. G., Paton, D., 1953: Size in the relation to the rate of migration in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Mycologia*, **45**: 235.

Bonner, J. T., Chiquoine, A. D., Kolderie, M. Q., 1955: A histochemical study of differentiation in the cellular slime molds. *J. Exp. Zool.*, **130**: 133.

Bonner, J. T., Shaw, M. J., 1957: The role of humidity in the differentiation of cellular slime molds. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **50**: 145.

Bonner, J. T., Adams, M. S., 1958: Cell mixtures of different species and strains of cellular slime molds. *J. Exp. Morphol.*, **6**: 346.

Bradley, Sussman, M., 1952: Growth of amoeboid slime molds in onemembered cultures. *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**: 462.

Bradley, S. G., Sussman, M., Ennis, H. L., 1956. Environmental factors affecting the aggregation of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Protozool.*, **3**: 33.

Brefeld, O., 1869: *Dictyostelium mucoroides*, ein neuer Organismus aus des Verwandschaft der Myxomyceten. *Abhand. Senckenberg. Naturf. Ges.*, Frankfurt, **7**: 85.

Brefeld, O., 1884: *Polysphondylium violaceum* und *Dictyostelium mucoroides*, nebst Bemerkungen zur Systematik der Schleimpilze. Untersuchungen aus Gesammtgebiete der Mycologie VI Heft: 1.

Cienkowski, L., 1873: Über einige protoplasmatische Organismen (według: Batalin Fust's Bot. Jahresb. Jahrg. 1: 63).

Coemans, E., 1863: Recherches sur le polymorphisme et les différents appareils de reproduction chez les mucorinés. *Bull. Acad. Royal Sci. Belg.*, **16**, Ser. 2: 501 (według Olive 1902).

Cohen, A. L., 1953: The effect of ammonia on morphogenesis in the *Acrasieae*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **39**: 68.

Cook, W. R. I., 1939: Some observations on *Sappinia pedata* Dang. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **22**: 302.

Dangeard, P. A., 1896: Contribution à l'étude des *Acrasiees*. *Le Botaniste*. 5: 1.

Ennis, H. L., Sussman, M., 1958a: Synergistic morphogenesis by mixtures of *Dictyostelium discoideum* wild-type and aggregatless mutants. *J. Gen. Microbiol.*, **18**: 433.

Ennis, H. L., Sussman, M., 1958b: The initiator cell for slime mold aggregation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **44**: 401.

Fayod, V., 1883: Beitrag zur Kenntnis niederer Myxomyceten. *Botan. Zeit.* **41**: 169.

Gamble, W. J., 1953: Orientation of the slime mold *Dictyostelium discoideum* to light. Senior thesis, Princeton University (według Bonnera, 1959).

Gazelius, K., Rånby, B. G., 1957: Morphology and fine structure of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Exp. Cel. Res.*, **12**: 265.

Gregg, J. H., 1950: Oxygen utilization in relation to growth and morphogenesis of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.*, **114**: 173.

Gregg, J. H., 1956: Serological investigations of cell adhesion in the slime mold *Dictyostelium discoideum*, *D. purpureum* and *Polysphondylium violaceum*. *J. Gen. Physiol.*, **39**: 913.

Gregg, J. H., Hackney, A. L. Krivanek, J. O., 1954: Nitrogen metabolism of the slime mold *Dictyostelium discoideum* during growth and morphogenesis. *Biol. Bull.*, **107**: 226.

Gregg, J. H., Bronsweig, R. D., 1956a: Dry weight loss during cultivation of slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **47**: 483.

Gregg, J. H., Bronsweig, R. D., 1956b: Biochemical events accompanying stalk formation in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **48**: 293.

Harper, R. A., 1926: Morphogenesis in *Dictyostelium*. *Bull. Torrey Botan. Club*, **53**: 229.

Harper, R. A., 1929: Morphogenesis in *Polysphondylium*. *Bull. Torrey Botan. Club*, **56**: 227.

Harper, R. A., 1932 Organization and light relation in *Polysphondylium*. *Bull. Torrey Botan. Club*, **59**: 49.

Hirschberg, E., Rusch, H. P., 1950: Effects of compounds of varied biochemical action on the aggregation of a slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **36**: 105.

Hirschberg, E., Rusch, H. P., 1951. Effect of 2,4-dinitrophenol on the differentiation of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **37**: 323.

Krivanek, J. O., 1956. Alkaline phosphatase activity in the developing slime mold *Dictyostelium discoideum* Raper. *J. Exp. Zool.* **133**: 459.

Krivanek, J. O., Krivanek, R. C., 1958. The histochemical localization of certain biochemical intermediates and enzymes in the developing slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Exp. Zool.*, **137**: 89.

Krzemieniewscy, H. i S., 1927: Z mikroflory gleby w Polsce. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **4**: 141.

Krzemieniewska, H., 1934: Przyczynek do znajomości miksobakterii i śluzowców boru sosnowego. *Spraw. Kom. Fizjogr. PAU*, **47**: 121.

Labudde, B. F., 1956: A cytological study of *Dictyostelium*. Master's thesis, University Wisconsin (według Bonnera, 1959b).

Michalska, I., Skupieński, F. Ks., 1938: Recherches écologiques sur les Acrasiées: *Polysphondylium pallidum* Olive, *Polysphondylium violaceum* Brefeld, *Dictyostelium mucoroides* Bref., *Compt. Rend. Ac. Sci. Paris*, 207: 1239.

Mühlethaler, K., 1956: Electron microscopic study of the slime mold *Dictyostelium discoideum. Amer. J. Botan.*, **43**: 673.

Nadson, G. A., 1899-1900: Des cultures pures des amibes en général. *Scripta Bot. Horti Univ. Imp. Petropolitanae*, **15**: 188 (według Rapera, 1937).

Oehler, R., 1922: *Dictyostelium mucoroides* Brefeld. *Zentr. Bakt. I*, **89**: 155.

Olive, E. W., 1901: Preliminary enumeration of the *Sorophoreae*. *Proc. Amer. Acad. Arts Sci.*, **37**: 333.

Olive, E. W., 1902: Monograph of the *Acrasieae*. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, **30**: 451.

Paddock, R. B., 1953: The appearence of amoebae tracks in cultures of *Dictyostelium discoideum. Science*, **118**: 597.

Pfützner-Eckert, R., 1950: Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an *Dictyostelium mucoroides* Brefeld. *Roux Archiv. Entwicklungsmech.*, **144**: 381.

Pinoy, E., 1903: Necessité d'une symbiose microbienne pour obtenir la culture des Myxomycètes. *Compt. Rend. Acad. Sci.* Paris, **137**: 580.

Pinoy, E., 1907: Rôle des bactéries dans le dévelopment de certains myxomycètes. *Ann. Inst. Pasteure*, **21**: 622, 686.

Potts, G., 1902: Zur Physiologie des *Dictyostelium mucoroides*. *Flora*, **91**: 281.

Raper, K. B., 1935: *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agric. Res.*, **50**: 135.

Raper, K. B., 1937: Growth and development of *Dictyostelium discoideum* with different bacterial associates. *J. Agric. Res.*, **55**: 289.

Raper, K. B., 1939: Influence of culture conditions upon the growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *J. Agric. Res.*, **58**: 157.

Raper, K. B., 1940a: The communal nature of the fruiting process in the *Acrasieae*. *Amer. J. Botan.*, **27**: 436.

Raper, K. B., 1940b: Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. *J. Elisha Mitchell. Sci. Soc.*, **56**: 241.

Raper, K. B., 1941: *Dictyostelium minutum*, a second new species of slime mold from decaying laeves. *Mycologia*, **33**: 633.

Raper, K. B., 1951: Isolation, cultivation and conservation of simple slime molds. *Quart. Rev. Biol.*, **26**: 169.

Raper, K. B., 1956a: *Dictyostelium polycephalum n. sp.*, a new cellular slime mold with coremiform fructification. *J. gen. Microbiol.*, **14**: 716.

Raper, K. B., 1956b: Factor affecting growth and differentiation in simple slime molds. *Mycologia*, **48**: 169.

Raper, K. B., Thom, Ch., 1932: The distribution of *Dictyostelium* and other slime molds in soil. *J. Washington Acad. Sci.*, **22**: 92.

Raper, K. B., Smith, N. R., 1939: The growth of *Dictyostelium discoideum* upon pathogenic bacteria. *J. Bact.*, **38**: 431.

Raper, K. B., Thom, Ch., 1941: Interspecific mixtures in the *Dictyosteliaceae*. *Amer. J. Botan.*, **28**: 69.

Raper, K. B., Alexander, D. F., 1945: Preservation of the molds by the lyofil process. *Mycologia*, **37**: 499.

Raper, K. B., Fennell, D. I., 1952: Stalk formation in *Dictyostelium discoideum Bull. Torrey Botan. Club.*, **79**: 25.

Raper, K. B., Quinlan, M. B., 1958: *Acytostelium leptosomum*: a unique cellular slime mold with an accellular stalk. *J. Gen. Microbiol.*, **18**: 16.

Rostafiński, J., 1875: Śluzowce, monografia. Paryż.

Runyon, E. H., 1942: Aggregation of seperate cells of *Dictyostelium* to form a multicellular body. *Collecting Net.* **17**: 88 (według Bonnera 1947).

Schuckmann, W. von, 1924: Zur Biologie von *Dictyostelium mucoroides* Bref. *Zentr. Bakter. I.* **91**: 302.

Shaffer, B. M., 1953: Aggregation in cellular slime molds: *in vitro* isolation of acrasin. *Nature*, **171**: 975.

Shaffer, B. M., 1956a: Properties of acrasin. *Science*, **123**: 1172.

Shaffer, B. M., 1956b: Acrasin, the chemotactic agent in cellular slime moulds. *J. Exp. Biol.*, **33**: 645.

Shaffer, B. M., 1957a: Aspect of aggregation in cellular slime moulds. *Amer. Naturalist*, **91**: 19.

Shaffer, B. M., 1957b: Properties of slime mould amoebae of significance for aggregation. *Quart J. Microscop. Sci.*, **98**: 377.

Shaffer, B. M., 1957c: Variability of behaviour of aggregation in cellular slime moulds. *Quart. J. Microscop. Sci.*, **98**: 393.

Shaffer, B. M., 1958: Integration in aggregating cellular slime moulds. *Quart. J. Microscop. Sci.*, **99**: 103.

Singh, B. N., 1946: Soil *Acrasieae* and their bacterial food supply. *Nature*, **157**: 133.

Singh, B. N., 1947a: Studies on soil *Acrasieae*. I. Distribution of species of *Dictyostelium* in soil of Great Britain and the effect of bacteria of their development. *J. Gen. Microbiol.*, **1**: 11.

Singh, B. N., 1947b: Studies on soil *Acrasieae*. II. The active life of species of *Dictyostelium* in soil and the influence thereon of soil moisture and bacterial food. *J. Gen. Microbiol.*, **1**: 361.

Skupieński, F. Ks., 1918: Sur la sexualité chez les espèces de Myxomycète Acrasiée: *Dictyostelium mucoroides*. *Compt. rend. Acad. Sci.* Paris, **167**: 960.

Skupieński, F. Ks., 1920: Recherches sur le cycle évolutif de certains Myxomycètes. Paris.

Slifkin, M. K., Bonner, J. T., 1952: The effect of the salts and organic solutes on the migration time of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biol. Bull.*, **102**: 273.

Slifkin, M. K., Gutowsky, H. S., 1958: Infrared spectroscopy as a new method for assessing the nutritional requirements of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **51**: 249.

Sorokin, N. X., 1871: Mikołogiczeskije oczerki. 3: 28. Charków (według Rostafińskiego, 1875, Śluzowce, str. 217).

Sussman, M., 1952: An analysis of the aggregation stage in the development of the slime mold *Dictyosteliaceae*. II. Aggregative center formation by mixture of *Dictyostelium discoideum* wild type and aggregatless variants. *Biol. Bull.*, **103**: 446.

Sussman, M., 1954: Synergistic and antagonistic interactions between morphogenetically deficient variants of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.*, **10**: 110.

Sussman, M., 1955: „Friuty" and other mutants of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*; a study of developmental aberrations. *J. Gen. Microbiol.*, **13**: 295.

Sussman, M., 1956a: The biology of the cellular slime molds. *Ann. Rev. Microbiol.*, **10**: 21.

Sussman, M., 1956b: On the relation between growth and morphogenesis in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biol. Bull.*, **110**: 91.

Sussman, M., 1958: A developmental analysis of cellular slime mold aggregation. A symposium on the chemical basis of development: 264-295. Baltimore, John Hopkins Press.

Sussman, M., Noël, E., 1952: An analysis of the aggregation stage in the development of the slime molds *Dictyosteliaceae*. I. The populational distribution of the capacity to initiate aggregation. *Biol. Bull.*, **103**: 259.

Sussman, M., Bradley, S. G., 1954: A protein growth factor of bacterial origin required by the cellular slime molds. *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**: 428.

Sussman, M., Lee, F., 1955: Interactions among variant and wild-type strains of cellular slime molds across thin agar membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **41**: 70.

Sussman, M., Lee, F., Kerr, N. S., 1956: Fractionation of acrasin, a specific chemotactic agent for slime mold aggregation. *Science*, **123**: 1171.

Sussman, R. R., Sussman, M., 1953: Cellular differentiation in *Dictyosteliaceae*: heritable modification of the developmental pattern. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**: 949.

Takeuchi, I., Tazawa, M., 1955: Studies on the morphogenesis of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Cytologia*, **20**: 157.

van Tieghem, P., 1880: Sur quelques myxomycètes à plasmode agrégé. *Bull. Soc. Botan. France*, **27**: 317.

van Tieghem, P., 1884: *Coenonia*, genre nouveau de myxomycètes à plasmode agrégé. *Bull. Soc. Botan. France*, **31**: 303.

Thom, Ch., Raper, K. B., 1930: Myxamoebae in soil and decomposing crop residues. *J. Washington Acad. Sci.*, **20**: 362.

Vuillemin, P., 1903: Une Acrasiée bactériophage. *Compt. rend. Acad. Sci.* Paris, **137**: 387.

Wittingham, W. F., Raper, K. B., 1956: Inhibition of normal pigment synthesis in spores of *Dictyostelium purpureum*. *Amer. J. Botan.*, **43**: 703.

Whittingam, W. F., Raper, K. B., 1957: Environmental factors influencing the growth and fructification of the *Dictyostelium polycephalum*. *Amer. J. Botan.*, **44**: 619.

Wilson, Ch. M., 1952: Sexuality in the *Acrasiales*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **38**: 659.

Wilson, Ch. M., 1953: Cytological study of the life cycle of *Dictyostelium*. *Amer. J. Botan.*, **40**: 714.

Wilson, Ch, M., Ross, I. K., 1957: Further cytological studies in the *Acrasiales*. *Amer. J. Botan.*, **44**: 345.

Wright, B. E., Anderson, M. L., 1958: Enzyme patterns during differentiation in the slime mold. A symposium on the chemical basis of development: 296-313. Baltimore, John Hopkins Press.

Zopf, W., 1885: Die Pilzthiere oder Schleimpillze. Seperata. Encyklop. Naturwissenschaft.

Zopf, W., 1892: Zur Kenntnis der *Labyrinthuleen*, einer Familie der Mycetozoen. Beitr. Physiol. Morphol. niedere Organism. Heft 2: 30.

Uzupełnienie po złożeniu pracy do druku:

Faust R. G., Filosa M. F., 1959: Permeability studies on the amoebae of the slime mold *Dictyostelium mucoroides*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **54**: 297.

Mave R. C., 1956: The diffusion of glucose into human red cell. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **47**: 177.

Olive L. S., Stoianovitch C., 1960: Two new members of the *Acrasiales*. *Bull. Torrey Botan. Club.*, **87**: 1.

Russel G. K., Bonner J. T., 1960: A note on spore germination in the Cellular Slime mold *Dictyostelium mucoroides*. *Bull. Torrey Botan. Club.*, **87**: 187.

Takeuchi I., 1960: The correlation of cellular changes with succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in the development of the cellular slime molds. *Developm. Biol.*, **2**: 343.

Adres autora:
Prof. Df Helena Krzemieniewska,
Instytut Botaniczny,
Wrocław, ul. Kanonia 6/8
Polska

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 81—91

Krystyna Włodarczak i *Janusz Jeljaszewicz*

BADANIA NAD KOAGULAZAMI GRONKOWCOWYMI

IV. ZACHOWANIE SIĘ GRONKOWCÓW W NORMALNYCH SUROWICACH BEZ DODATKU I Z DODATKIEM WOLNEJ KOAGULAZY

Ze Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej m. Poznania i Zakładu Mikrobiologii Akademii Medycznej w Poznaniu

Otrzymano 10 marca 1960 r.

Streszczenie:

Wykazano, że wzrost gronkowców koagulazo-dodatnich w surowicy uwarunkowany jest nie tyle obecnością wolnej koagulazy, co występowaniem w hodowlach tych bakterii jakiegoś czynnika zobojętniającego działanie surowicy. Gronkowce koagulazo-ujemne rozmnażają się swobodnie w surowicy po dodaniu przesączu hodowli gronkowców koagulazo-dodatnich, natomiast dodatek oczyszczonej koagulazy nie wywiera żadnego wpływu.

Surowice większości ssaków wykazują właściwości bakteriobójcze w stosunku do licznych drobnoustrojów.

Na temat działania surowicy na gronkowce istnieje stosunkowo niewiele doniesień. Spink i Paine (1940) stwierdzili, że gronkowce koagulazo-dodatnie są wysoce oporne na działanie surowic pochodzących od osobników chorych i zdrowych. Tobler i Pinner (1943) natomiast zaobserwowali w płynie opłucnowym chorych na gruźlicę substancję hamującą rozmnażanie się gronkowców. Thomson i Khorazo (1938) wykazali, że gronkowce należące do typu serologicznego *A* (chorobotwórcze), znacznie łatwiej rozmnażają się w surowicy niż szczepy należące do innych typów. Spink i Vivino (1942) potwierdzili łatwe rozmnażanie się gronkowców koagulazo-dodatnich w surowicy ludzkiej: wśród 70 szczepów nie wydzielających koagulazy tylko 2 okazały wzrost w tych warunkach. Tejler (1937) oraz Fishman i Shechmeister (1955) wykryli w surowicy ciepłostałą substancję, hamującą rozmnażanie niektórych szczepów gronkowców. Braun (1949) opisał względnie ciepłostały czynnik, występujący w normalnej surowicy i dzia-

łający hamująco na rozmnażanie *Brucella abortus* i *Staphylococcus aureus*; czynnik ten znajdował się we frakcji globulinowej.

W 1955 r. Ekstedt i Nungester ogłosili, że stężone preparaty koagulazy znoszą antybakteryjne działanie surowicy na szczepy koagulazo-ujemne. Ekstedt (1956a, 1956b) uważa, że zdolność do rozwoju w normalnej surowicy szczepów koagulazo-dodatnich jest związana z wytwarzaniem przez nie wolnej koagulazy. Jego zdaniem aktywny czynnik jest białkiem lub sympleksem białkowym, występującym stale w surowicy; jest on nieswoisty serologicznie i można go usunąć przez adsorpcję na gronkowcach, paciorkowcach, dwoinkach zapalenia płuc, pałeczkach duru brzusznego i laseczkach wąglika. Aktywują go jony Ca . Swoiste surowice odpornościowe działają silniej na gronkowce niż surowica normalna.

Myrvik i Wesier (1955) oraz Myrvik (1956) stwierdzili jednak, że czynniki hamujące rozmnażanie *Staphylococcus albus* i *Bacillus subitilis* są bardzo do siebie podobne. Układ ten nie wymaga — ich zdaniem — żadnych czynników współdziałających i nie jest zależny od składników dopełniacza. Myrvik uważa, że czynnik bakteriobójczy surowicy nie ma też przypuszczalnie związku z systemem properdyny. W doświadczeniach z koagulazą wykazał, że nie usuwa ona działania bakteriobójczego surowicy w stosunku do szczepów koagulazo-ujemnych; wyniki uzyskane przez Ekstedta nie zostały więc potwierdzone. Myrvik wysuwa hipotezę, że przyczyną łatwego rozmnażania się gronkowców koagulazo-dodatnich w surowicy może być obecność otoczek lub zmieniony ich metabolizm.

Rozbieżne wyniki uzyskane przez cytowanych autorów oraz znaczenie tego problemu skłoniły nas do podjęcia doświadczeń, dotyczących zachowania się gronkowców koagulazo-dodatnich i koagulazo-ujemnych w normalnych surowicach.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy bakterii: izolację przeprowadzono w sposób opisany poprzednio (Jeljaszewicz, 1958a). Badano 169 szczepów wydzielających obie koagulazy, z czego 87 pochodziło z materiału chorobowego, 46 z gardła zdrowych nosicieli, a 36 stanowiły szczepy laboratoryjne. Szczepy pochodzące z materiału chorobowego wyselekcjonowano, opierając się na ich zdolności do wydzielania dużych ilości wolnej koagulazy. Charakterystyka badanych szczepów podana jest w tabeli I.

Podłoże: bulion mózgowo-sercowy z dodatkiem mieszaniny jonowej (Jeljaszewicz, 1958c).

Wytwarzanie pigmentu: posiew na surowicę Loefflera. Po 18-godzinnej inku-

bacji w temperaturze 37° hodowlę pozostawiono na 7 dni w temperaturze pokojowej.

Wytwarzanie hemolizyn: przyrządzano agar z krwią baranią; agar ten umieszczano w cienkiej warstwie na 3-procentowym agarze w wodzie destylowanej. Szczepy posiewano pasmami i inkubowano w atmosferze 20% CO_2 i 80% powietrza przez 24 godziny w temperaturze 37°. Następnie płytki umieszczano w temperaturze 4° na 24 godziny, po czym dokonywano ostatecznego odczytania wyników.

Wytwarzanie fosfatazy: oznaczano metodą Barber, Brooksbank i Kuper (1951), na podłożu płynnym z dodatkiem 0,1% soli sodowej kwasu fenolftaleino-fosforowego (Fishman, Springer i Brunetti, 1948).

Fermentacja mannitolu i glikozy: stosowano bulion zwykły z dodatkiem 1% mannitolu lub glikozy. Rozkład tych związków w warunkach beztlenowych badano na tym samym podłożu, pokrytym zaraz po zagotowaniu warstwą parafiny.

Wytwarzanie żelatynazy: posiewano badany szczep na żelatynę w słupku i inkubowano przez 2 tygodnie w temperaturze ±20°.

Wytwarzanie katalazy: na 18-godzinną hodowlę na podłożu stałym nalewano kilka kropli 3-procentowego roztworu H_2O_2.

Wytwarzanie koagulazy wolnej i związanej. Miano wolnej koagulazy: oznaczano metodami opisanymi szczegółowo poprzednio (Jeljaszewicz, 1958b).

Koagulaza: stosowano 3 rodzaje wolnej koagulazy: 1. Oczyszczony preparat o mianie 1 : 10 240-1 : 40 960 (1-10 mg/ml), przygotowany według nieznacznie zmodyfikowanej metody Tagera (Jeljaszewicz, 1958c).

2. Preparat otrzymany od prof. M. Tagera, posiadający aktywność rzędu 1 : 10 240 (10 mg/ml).

3. Przesącz hodowli szczepu *J-373*, stosowanego do otrzymywania preparatów koagulazy, opisanych w punkcie 1.

Surowice:

Stosowano 7 rodzajów surowic:

A. Krew pobraną od 34 zdrowych osób odwirowano w ciągu 10-30 minut od pobrania i natychmiast zamrażano (od momentu pobrania do zamrożenia nie upływało więcej niż 1 godzina), po czym przechowywano w temperaturze —15°.

B. Krew pobraną od 1 zdrowej osoby pozostawiano na 2-4 godziny w temperaturze pokojowej, odwirowywano, a surowicę pozostawiano na 18 godzin w temperaturze 4°. Następnie surowicę zamrażano i przechowywano w temperaturze —15°.

C. Krew pobierano jak w punkcie B. Przed wykonaniem oznaczenia umieszczano ją na 7 dni w temperaturze 4°.

D. Krew pobrana od 12 zdrowych osób w taki sam sposób jak w punkcie A.

E Krew pobraną od 3 zdrowych osób natychmiast odwirowywano i w ciągu 30 minut oznaczano działanie na gronkowce.

F-G. Pobierano krew z serca zdrowych królików i świnek morskich, natychmiast odwirowywano i oznaczano nie później niż w 2 godziny od pobrania.

Obliczanie ilości żywych bakterii: pobierano próbki (0,1 ml) surowicy, po 0 i 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37° i dodawano do 9,9 ml 3-procentowego agaru na bulionie mózgowo-sercowym, ostudzonego do ±50°. Płytki inkubowano przez 24 godziny w 37°, po czym obliczano ilość kolonii, a otrzymane wyniki przeliczano na 1 ml surowicy. W każdym oznaczeniu posiewano 2 płytki.

WYNIKI

Badane szczepy koagulazo-dodatnie wydzielały znaczne ilości wolnej koagulazy. Około połowa szczepów wyosobnionych z przypadków chorobowych wykazywała miano wolnej koagulazy w granicach od 1 : 1280 do 1 : 5120. Szczepy selekcjonowano po wstępnym oznaczeniu jakościowym; brano pod uwagę tylko szczepy powodujące szybkie krzepnięcie osocza. Szczegółowe dane przedstawione są w tabelach I i II.

169 szczepów silnie koagulazo-dodatnich wydzielało także koagulazę związaną. 28 szczepów nie wytwarzających koagulazy wolnej nie zawierało też koagulazy związanej. Występowanie omówionych czynników wśród gronkowców szczegółowo zestawiono w innych opracowaniach (Jeljaszewicz, 1959a, 1959b; Jeljaszewicz i Skalmowski, 1959; Jeljaszewicz i Goncerzewicz, 1960a i 1960b).

Wstępne doświadczenia wykazały, że nie można uzyskać miarodajnych wyników przy zastosowaniu liofilizowanej surowicy pochodzącej ze Stacji Krwiodawstwa, a także surowicy przechowywanej przez okres dłuższy niż 48 godzin w temperaturze pokojowej lub chłodni. Z innych doświadczeń wiadomo, że osocze zawierające płyn konserwujący stosowany do przechowywania krwi — nie nadaje się do oznaczania koagulazy (Jeljaszewicz 1958a; Włodarczak i Jeljaszewicz, 1960; Jeljaszewicz, 1960; Jeljaszewicz i Włodarczak, 1960). Należy stosować surowice pochodzące od kilkunastu lub kilkudziesięciu dawców. Surowice zamrożone, przechowywane w temperaturze —15° przez okres 1 miesiąca, nadają się w zasadzie do oznaczeń. Własności bakteriobójcze surowic przechowywanych w stanie zamrożonym są jednak słabiej zaznaczone.

Tabela III przedstawia wzrost gronkowców koagulazo-dodatnich i koagulazo-ujemnych w surowicach ludzkich. Wyniki uzyskane przy ich zastosowaniu porównywano z danymi otrzymanymi przy użyciu surowicy A.

Stwierdzono, że gronkowce silnie koagulazo-dodatnie rozmnażają się z łatwością w surowicy. Żaden z badanych szczepów koagulazo-ujemnych nie rozmnażał się natomiast w surowicy.

25 szczepów koagulazo-ujemnych poddano dalszym obserwacjom: nie rozmnażały się one w normalnej surowicy. W I serii do surowicy dodawano bakterie według sposobu podanego powyżej, inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°, po czym obliczano ilość żywych komórek. W drugiej serii dodawano ponadto 0,2 ml koagulazy w postaci płynu z odwirowanej hodowli, a w trzeciej — 0,4 ml takiego płynu. Surowica bez dodatku płynu z odwirowanej hodowli zwalniała rozmnażanie się gronkowców. Wyjątkowo tylko obserwowano całkowite zahamowanie rozmnażania się gronkowców koagulazo-ujemnych. W większości przypad-

Tabela I
Charakterystyka badanych szczepów
Characteristics of examined strains

Ilość szczepów Number of strains	Koagulaza Coagulase	Pigment złocisty Pigment		Hemoliza β Haemolysis		Fosfataza Phosphatase		Fermentacja mannitolu beztlenowa Mannitol fermentation		Fermentacja glikozy beztlenowa Glucose fermentation		Katalaza Catalase		Żelatynaza Gelatine liquefation	
		+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
169	169	151	18	168	1	166	3	169	−	169	−	169	−	154	15
28	0	3	23	2	22	18	10	−	28	28	−	28	−	4	24

Tabela II
Miano wolnej koagulazy u badanych szczepów
Titre of free coagulase in examined strains

Pochodzenie szczepów Source of isolation	Ilość szczepów Number of strains	Miano — Titer									
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
Z materiału chorobowego Pathological material	87	5	12	11	5	5	3	4	2	5	35
Szczepy laboratoryjne Museal strains	36	—	—	1	—	—	3	2	2	1	27
Z gardła osób zdrowych Throat of healthy person	46	—	7	4	9	6	3	3	3	—	11
Razem Total	169	5	19	16	14	11	9	9	7	6	63

Tabela III

Rozwój koagulazo-dodatnich i koagulazo-ujemnych szczepów gronkowców w surowicach pobieranych i przechowywanych w różny sposób

Growth of coagulase-positive and negative strains of *Staphylococcus* in serum

Surowica stosowana do doświadczenia Serum	Wolna koagulaza Free coagulase	Ilość badanych szczepów Number of strains	Wynik po godzinach Time of examination (hours)	Ilość bakterii 10^7 w 1 mililitrze surowicy Bacterial count 10^7 cells per 1 ml of serum							
				2—10	10—50	50—100	100—400	400—800	800—1000	1000—1500	150
A*	+	169	0	26	73	40	25	4	1	—	—
A*	+	169	24	3	10	5	25	58	18	46	4
B*	—	28	0	6	16	2	4	—	—	—	—
B*	—	28	24	3	12	8	5	—	—	—	—
C*	—	16	0	3	7	2	4	—	—	—	—
C*	—	16	24	2	5	4	5	—	—	—	—

* Objaśnienia w materiałach i metodach

* A — sera from 34 healthy persons, freezed during the 1st hour after collections; stored at —15°C.

B — serum obtained 2-4 hours after collection of the blood; serum stored at +4°C during 18 hours, then freezed and stored at —15°C.

C — as „B", before examination transfered for 7 days to +4°C.

ków stwierdzono nieznaczne powiększenie ilości żywych komórek po 24-godzinnej inkubacji. Natomiast dodatek płynu z odwirowanej hodowli powodował wielokrotne zwiększenie ilości bakterii w surowicy. Dodatek 0,2 ml takiego płynu, zawierającego m. in. koagulazę, powodował kilkakrotny wzrost ilości komórek, równy na ogół liczbie osiąganej przez szczepy koagulazo-dodatnie. Dodatek 0,4 ml powodował jeszcze obfitszy rozwój badanych szczepów, po 24 godzinach osiągający 1500×10^7-2000×10^7 i więcej komórek na mililitr.

Badano także wpływ wysoce oczyszczonych preparatów wolnej koagulazy. Uzyskano przy tym zaskakujące wyniki. Preparaty te, posiadają wysoką aktywność biologiczną (krzepnięcie osocza powodowały jeszcze w rozcieńczeniu 1 : 40 960), nie wywierały wyraźniejszego wpływu na bakteriobójcze własności surowicy w stosunku do gronkowców koagulazo-ujemnych. Natomiast przesącz hodowli, jak wyżej wspomniano, działa wyraźnie stymulująco na wzrost takich szczepów. W związku z uzyskanymi wynikami należy podać w wątpliwość hipotezę, przypisującą wolnej koagulazie zdolność do znoszenia bakteriostatycznych właściwości surowicy w stosunku do gronkowców koagulazo-ujemnych.

Należy raczej przypuszczać, że jakiś nieznany dotąd czynnik, zawarty w przesączu hodowli lub uwalniany z komórek podczas ich rozpadu, zobojętnia działanie surowicy. Typowe wyniki uzyskane ze szczepami koagulazo-ujemnymi, hodowanymi bez płynu i z dodatkiem płynu z odwirowanej hodowli, przedstawione są w tabeli IV.

Podczas badań zwrócono uwagę, że w wielu przypadkach zupełnie przejrzyste surowice zawierają znaczne ilości gronkowców koagulazo-ujemnych. Przekonano się, że surowica, zawierająca około 5×10^9 gronkowców koagulazo-ujemnych na mililitr, może pozostać całkowicie przeźroczysta. Natomiast nawet mała ilość gronkowców koagulazo-dodatnich powoduje łatwo dostrzegalne zmętnienie. Warto przypomnieć w związku z tym pracę, którą opublikowali Wichelhausen, Clark, Griffing i Robinson (1958). Zaobserwowali oni, że 25-procentowe roztwory frakcji albuminowej surowicy mogą zawierać ponad 2×10^8 bakterii na mililitr i nie wykazywać zmętnienia.

Zauważono także, że przy zastosowaniu większych objętości surowicy (20 ml zamiast 1 ml) uzyskuje się dokładniejsze wyniki.

Odmienne dane niż z surowicami ludzkimi uzyskano z surowicami świnki morskiej i królika. Nie tylko wszystkie badane szczepy koagulazo-dodatnie, ale i koagulazo-ujemne silnie rozwijały się w obu tych surowicach. Szczególnie silny rozwój szczepów koagulazo-ujemnych zauważono w surowicy króliczej (tabela V).

Tabela IV

Wpływ płynu z odwirowanej hodowli koagulazo-dodatniego szczepu *J-373* na rozmnażanie się gronkowców koagulazo-ujemnych w surowicy ludzkiej.
Influence of supernatant of the culture of coagulase-positive strain *J-373* upon the growth of coagulase negative strains in human serum.

Nr szczepu Strain No	Ilość ml płynu z odwirowanej hodowli dodana do 1 ml surowicy Amount of supernatant per 1 ml of serum	Ilość komórek w 1 ml surowicy po 24 godz. inkubacji w 37°C Number of bacterial cells per 1 ml after 24 hours of incubation at 37°C	Zmętnienie Turbidity
3278	0	32	—
	0,2	1250×10^7	+++
	0,4	1800×10^7	++++
9	0	5	—
	0,2	850×10^7	+++
	0,4	1500×10^7	++++
291	0	22×10^7	—
	0,2	800×10^7	+++
	0,4	1500×10^7	++++
3241	0	12×10^7	—
	0,2	800×10^7	+++
	0,4	1500×10^7	++++
17	0	467×10^7	—
	0,2	1800×10^7	+++
	0,4	ponad 2000×10^7	++++
261	0	308×10^7	—
	0,2	1500×10^7	+++
	0,4	ponad 2000×10^7	++++
215	0	9×10^7	—
	0,2	1200×10^7	+++
	0,4	ponad 1800×10^7	++++
2236	0	11×10^7	—
	0,2	985×10^7	+++
	0,4	1589×10^7	++++
3243	0	15×10^7	—
	0,2	1200×10^7	+++
	0,4	ponad 1800×10^7	++++

— = brak zmętnienia, no turbidity +++ = silne zmętnienie, strong turbidity ++++ = bardzo silne zmętnienie very strong turbidity

Tabela V

Rozwój gronkowców koagulazo-dodatnich i koagulazo-ujemnych w surowicy króliczej i świnki morskiej (ilość bakterii w 10^7 na 1 ml)

Growth of staphylococci in rabbit's and guinea pig's sera (number of cells, 10^7 per 1 ml)

Surowica świnki morskiej			Guinea pig's serum			Surowica królicza			Rabbit's serum		
Nr szczepu Strain No	Godziny inkubacji Hours of incubation		Nr szczepu Strain No	Godziny inkubacji Hours of incubation		Nr szczepu Strain No	Godziny inkubacji Hours of incubation		Nr szczepu Strain No	Godziny inkubacji Hours of incubation	
	0	24		0	24		0	24		0	24
	Szczepy koagulazo-dodatnie			Szczepy koagulazo-ujemne			Szczepy koagulazo-dodatnie			Szczepy koagulazo-ujemne	
100	2	1500	*2236*	5	1300	*100*	4	2000	*2236*	529	1800
88	587	1500	*3239*	7	1430	*88*	300	2000	*3239*	583	2000
90	41	1500	*16*	3	370	*90*	18	2000	*16*	130	850
71	27	1500	*7*	28*	407	*71*	20	2000	*7*	32	733
98	36	1500	*375*	2	1200	*98*	7	2000	*375*	628	2000
72	58	2000	*3*	10*	353	*72*	28	2000	*3*	96	680
87	77	1800	*8*	12*	28	*87*	18	2000	*8*	42	389
89	50	1800	*290*	32*	730	*89*	23	2000	*290*	145	1800
91	5	1500	*230*	22*	560	*91*	12	2000	*230*	165	1500
105	44	1500	*299*	4	2000	*105*	33	2000	*299*	1030	2000

* Pojedyncze kolonie
Single colonies

Autorzy korzystają ze sposobności, by podziękować Prof. Morrisowi Tagerowi, M. D. (Department of Bacteriology and Immunology, Division of Basic Health Science, Emory University, Georgia) za łaskawie użyczony preparat oczyszczonej koagulazy. Surowice, stosowane w części pracy, otrzymano dzięki wielkiej uczynności mgr Aliny Dziurowicz-Gabryś z Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Katowicach. Autorzy dziękują też mgrowi Kozłowskiemu z Miejskiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Poznaniu za pomoc podczas przygotowywania pożywek i niektórych odczynników.

LITERATURA

Barber, M., Brooksbank, B. W. L., Kuper, S. W. A., 1951: Staphylococcal phosphatase, glucoronidase and sulphatase. *J. Path. Bact.*, **63**: 57.

Braun, W., 1949: Studies on bacterial variation and selective environment. I. The nature of selective serum factors affecting the variation of *Brucella abortus*. *J. Bact.*, **58**: 291.

Ekstedt, R. D., 1956a: Further studies on antibacterial activity of human serum on *Micrococcus pyogenes* and its inhibition by coagulase. *J. Bact.*, **72**: 157.

Ekstedt, R. D., 1956b: The effect of coagulase on the antibacterial activity of normal human serum against selected strains of *Micrococcus pyogenes*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **65**: 119.

Ekstedt, R. D., Nungester, W. J., 1955: Coagulase in reversing antibacterial activity of normal human serum on *Micrococcus pyogenes*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **89**: 90.

Fishman, M., Shechmeister, I. L., 1955: The effect of ionizing radiation on phagocytosis and the bactericidal power of blood. II. *J. Exp. Med.*, **101**: 275.

Fishman, W. H., Springer, B., Brunetti, R, 1948: Application of improved glucoronidase assay method to study of human blood beta-glucoronidase. *J. Biol. Chem.*, **173**: 449.

Jeljaszewicz, J., 1958a: Wartość podłóż selektywnych stosowanych do wyosabniania *Micrococcus pyogenes* (*Staphylococcus*). *Pol. Tyg. Lek.*, **13**: 1235.

Jeljaszewicz, J., 1958b: Badania nad koagulazami gronkowcowymi: I. Metody oznaczania wolnej i związanej koagulazy. *Acta Microbiol. Polon.*, **7**: 17.

Jeljaszewicz, J., 1958c: Badania nad koagulazami gronkowcowymi: II. Otrzymywanie oczyszczonych preparatów wolnej koagulazy. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **10**: 287.

Jeljaszewicz, J., 1959a: Badania nad koagulazami gronkowcowymi: V. Obserwacje ilościowe, dotyczące wytwarzania wolnej koagulazy przez szczepy gronkowców, pochodzące z różnych źródeł. *Med. Dośw. Mikrobiol.* (w druku).

Jeljaszewicz, J., 1959b: Badania nad koagulazami gronkowcowymi: VI. Występowanie różnych czynników toksycznych i cech biochemicznych wśród koagulazo-dodatnich i koagulazo-ujemnych szczepów gronkowców. *Med. Dośw. Mikrobiol.* (w druku).

Jeljaszewicz, J., Goncerzewicz, M., 1960a: Oleandomycin-tetracycline in the treatment of infections in children; *in vivo* and *in vitro* study. *Antibiotics and Chematherapy* (w druku).

Jeljaszewicz, J., Goncerzewicz, M., 1960b: Spiramycin in the treatment of infections in children; *in vivo* and *in vitro* study. *Antibiotics and Chemotherapy* (w druku).

Jeljaszewicz, J., Skalmowski, T., 1959: Dynamika nosicielstwa *Staphylococcus* wśród personelu szpitalnego i dzieci hospitalizowanych. *Pediatria Pol.*, **34**: 390.

Jeljaszewicz, J. Włodarczak, K., 1960: Inhibitory action of some compounds on staphylococcal coagulase. *Experientia* (w druku).

Myrvik, Q. N., 1956: Serum bacteriocidins against Gram-positive bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **66**: 391.

Myrvik, Q. N., Weiser, R. S., 1955: Studies on antibacterial factors in mammalian tissues and fluids: I. A serum bactericidin for *Bacillus subtilis*. *J. Immunol.*, **74**: 9.

Spink, W. W., Paine, J. R., 1940: The bactericidal power of blood from patients and normal control for *Staphylococcus*. *J. Immunol.* **38**: 383.

Spink, W. W., Vivino, J. J., 1942: The coagulase test for staphylococci and its correlation with the resistance of the organisms to the bactericidal action of human blood. *J. Clin. Invest.* **21**: 353.

Tejler, T., 1937: Some experiments on the bactericidal effect of normal serum on *Staphylococcus pyogenes aureus*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **14**: 1.

Thompson, T., Khorazo, D., 1938: Differential growth of the antigenic types of staphylococci in human sera. *J. Bact.*, **35**: 51.

Tobler, A. B., Pinner, M., 1943: The effect of pleural effusions on the growth of *Staphylococcus aureus in vitro*. *J. Bact.* **45**: 341.

Wichelhausen, R. H., Clark, W. H., Griffing, V. F., Robinson, L. B., 1958: The concealment of heavy bacterial contamination in 25% human serum albumin; its mechanism and clinical significance. *J. Lab. Clin. Med.*, **51**: 276.

Włodarczak, K., Jeljaszewicz, J., 1959: Badania nad koagulazami gronkowcowymi: VII. Działanie antybiotyków, sulfonamidów, antyseptyków, kwasów nukleinowych, dekstranów i związków nieorganicznych na aktywność wolnej koagulazy. *Arch. Immun. Ter. Dośw.* (w druku).

Krystyna Włodarczak and *Janusz Jeljaszewicz*

STUDIES ON STAPHYLOCOCCAL COAGULASE

IV. GROWTH OF STAPHYLOCOCCI IN NORMAL SERA WITH AND WITHOUT ADDED COAGULASE

Summary

Growth of 169 coagulase-positive and 28 coagulase-negative strains of *Staphylococcus aureus* in human, rabbit and guinea-pig sera was examined (Table I, II).

It was shown that bacteriocidal and bacteriostatic properties of serum were depending on the method of preservation (Table III).

Human serum inhibited the growth of all tested coagulase-negative strains; no inhibition was noted with coagulase-positive bacteria (Table III).

The purified coagulase did not influence bacteriostatic activity of serum. On the other hand filtrate of the culture of coagulasepositive strain *J-373* — inactivated bacteriostatic property of serum In the presence of this filtrate all examined coagulase-negative strains grew well in the serum (Table IV).

There was observed the lack of any anti-staphylococcal activity in normal sera of a rabbit or a guinea-pig (Table V).

Adres autorów:
Authors' address:
Krystyna Włodarczak,
Poznań, Aleja Wielkopolska 45.
Polska

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10: 93—100

Władysław Myśków

THE OCCURRENCE OF MICROORGANISMS SOLUBILISING PHOSPHORUS IN THE RHIZOSPHERE OF SOME CROP PLANTS

From the Department of Soil Microbiology, IUNG, Puławy

Received 2nd July 1959

Summary

The microorganisms able to dissolve calcium phosphate are shown to be numerous in the rhizosphere of examined crop plants. The most active in this respect microbial populations were found on the roots of lupine. The microorganisms decomposing yeast nucleic acid and glycerophosphate are very abundant in the rhizosphere.

Crop plants vary in their capacity of taking up phosphorus from its less available compounds. This capacity depends on the quantity and the quality of root secretions of the plants, on the enzymatic activity of roots and of the association of microorganisms living in the plant rhizosphere.

Older authors as Liebig (1858) and Sachs (1860 as quoted by Czapek 1896), Dietrich (1862), Czapek (1896, 1905), Kunze (1906), Stoklasa a. Ernest (1908), Prianisznikow (1934) showed the effect of the plants root secretion on the dissolution of mineral compounds of phosphorus.

Lately (since 1948) the influence of rhizosphere microorganisms on the solubilisation of mineral phosphorus compounds has been often studied. Gerretsen (1948) showed that microorganisms in the rhizosphere of crop plants take an active part in the dissolving of calcium phosphate. Gołębiowska (1957) found more microorganisms dissolving these compounds in the rhizosphere of lupine than in the rhizosphere of oats and potatoes. Rubieńczyk (1955) applied P^{32} to study of the influence of microflora on plant nutrition. He showed that microor-

ganisms assimilated phosphorus and then secreted a part of it into their surroundings. The same problem was studied by Smalij (1956), Kotelew and Sabielnikowa (1955), Kotelew (1955a, b) and Własiuk and Manzon (1955).

EXPERIMENTAL RESULTS

It was the aim of the present research to enumerate the microorganisms dissolving calcium phosphates as well as those which mineralize organic compounds of phosphorus in the rhizosphere of different crop plants. At the same time the changes in the composition of the microbial associations in the rhizosphere of plants in relation to the growth stage of the plants were examined. The investigations were carried out in 1955 and 1956 on the following crop plants: barley, oats, flax, buckwheat, potatoes, lupine and peas, cultivated in loamy sand.

The activity of the microflora in the transformation of phosphorus compounds was determined by the qualitative and quantitative methods, based on the papers of Lochhead a. Taylor (1938), Gołębiowska (1956, 1957) and of Nowotny-Mieczyńska and Gołębiowska (1956). A droplet technique described by the author in his doctor's thesis * was also used.

The total number of microorganisms in the rhizosphere of the examined plants and the percentage of microorganisms dissolving tricalcium phosphate and those which mineralize glycerophosphate (pharmaceutical), lecithine and nucleic acid from yeast (both Polish commercial preparations) were determined. The droplet technique consisted in placing 25 drops of adequately diluted suspension from the examined plants on the surface of test agar medium. In this way the frequency of appearance of associations of calcium phosphate dissolving microorganisms and the degree of their activity (measured by the width of clear zones around microbial growth) were estimated.

THE TOTAL NUMBER OF BACTERIA AND ACTINOMYCETES

The total number of bacteria and actinomycetes in the rhizosphere of plants increased as the plants matured (Table I).

There were more microorganisms on the roots of leguminous plants (lupine and peas) than on the roots of other plants, and least of all on the roots of buckwheat.

The microflora on the roots of leguminous plants was chiefly composed of bacteria, while actinomycetes were found in considerable number on the roots of other plants. On the roots of buckwheat there were more actinomycetes than bacteria.

* "Investigations on microorganisms dissolving calcium phosphates".

Table I

The numbers of microorganisms in the rhizosphere of some crop plants depending on the stage of plant growth, millions per 1 g of dry roots

Liczebność drobnoustrojów w rizosferze roślin uprawnych w zależności od ich rodzaju i okresu rozwoju, w milionach na 1 g s. m. korzeni

Successive stages of plant growth / Kolejne okresy rozwoju rośliny	Oats / Owies		Buckwheat / Gryka		Potatoes / Ziemniaki		Lupine / Łubin		Peas / Groch	
	Years / Lata									
	1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1956
1	80	—	19	—	60	—	880	—	420	—
2	41	11	21	8	86	62	88	27	55	14
3	74	5	18	8	174	31	290	56	1740	24
4	470	11	132	31	640	137	670	46	28000	1030
5	460	870	134	121	700	754	1270	3570	19000	20166

MICROORGANISMS DISSOLVING CALCIUM PHOSPHATE

Calcium phosphates dissolving microorganisms were of irregular occurrence. In the different stages of the plant's growth their number amounted to 2-80 p. c. of the total number of bacteria and actinomycetes (Table II). In view of so great fluctuations it is difficult to estimate which plants favoured the development of this microflora. Majority of isolated strains were only slightly able to dissolve calcium phosphates. Forms dissolving actively these compounds appeared very rarely.

Table II

The frequency of strains able to dissolve $Ca_3(PO_4)_2$ in the rhizosphere of some crop plants. Per cent of total number of microorganisms

Procentowy udział drobnoustrojów rozpuszczających $Ca_3(PO_4)_2$ w zespołach mikroflory z rizosfery niektórych roślin uprawnych

Successive stages of plant growth / Kolejne okresy rozwoju rośliny	Oats / Owies		Buckwheat / Gryka		Potatoes / Ziemniaki		Lupine / Łubin		Peas / Groch	
	Years / Lata									
	1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1956
1	2	—	24	—	75	—	8	—	14	—
2	47	26	40	3	37	38	32	43	25	12
3	46	44	45	40	52	42	48	63	44	22
4	41	24	22	5	82	35	62	13	—	10
5	32	37	42	17	22	19	41	38	56	36

We have noted that the activity of total microbial rhizosphere population could be stronger than the activity of any single strain (Table III).

Table III

The ability * of the total microbial populations from the plant rhizosphere to dissolve $Ca_3(PO_4)_2$
Stopień uzdolnienia * całych zespołów mikroflory przykorzeniowej do rozpuszczania $Ca_3(PO_4)_2$ w zależności od rodzaju rośliny i okresu jej rozwoju

Successive stages of plant growth Kolejne okresy rozwoju rośliny	Oats Owies		Buckwheat Gryka		Potatoes Ziemniaki		Lupine Łubin		Peas Groch		Barley Jęczmień		Flax Len	
	Years Lata													
	1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1955	1955	1956	1955	1956
1	not examined	++	not examined	++	not examined	+	not examined	+++	not examined	+	not examined	+	not examined	0—+
2	nie badano	+++	nie badano	+	nie badano	++	nie badano	+	nie badano	+	nie badano	+	nie badano	0—+
3	+	++	+++	+	+	0—+	+++	+	++	+++	+—++	+	+—++	0—+
4	+++	++	++	0—+	+	+	+++	+	++	+	++	+	++	+
5	++	+	0—+	+	0—+	0—+	++	++	not examined nie badano		++	++	+—++	+—++

The ability to dissolve $Ca_3(PO_4)_2$:
Stopień uzdolnienia do rozpuszczania $Ca_3(PO_4)_2$:

0 — +	very slight bardzo słaby
+	slight słaby
++	moderate umiarkowany
+++	strong silny

* Determined with use of droplet technique on the basis: a) of the degree of medium clearing around growing colonies of the investigated population, b) of per cent of agar plate surface with $Ca_3(PO_4)_2$ dissolved by microorganisms
Określono przy pomocy metody rozcieńczeń na podstawie: a) stopnia przejaśnienia pożywki wokół wyrastających kolonii badanego zespołu, b) % powierzchni płytki z rozpuszczonym przez drobnoustroje $Ca_3(PO_4)_2$

Associations of microorganisms characterized by great activity in dissolving calcium phosphates appeared most frequently in the rhizosphere of lupine, oats and peas. The associations isolated from the roots of other plants, especially potatoes and flax, were only slightly active.

We noted that these microbial associations were developed specially abundantly during the time of flowering of the plants. Some deviations from this rule were always observed, due, may be, to specific soil conditions.

It seems that in experiments conducted during 1956, conditions for the development of microorganisms dissolving calcium phosphate were less favourable than in 1955. This is perhaps, why the influence of different plants and of the stage of their growth on the development of this microflora was less marked in 1956.

MICROORGANISMS MINERALIZING ORGANIC PHOSPHORUS COMPOUNDS

The roots of crop plants were also an excellent environment for the growth of microorganisms mineralizing organic phosphorus compounds. Their number amounted to 70 p. c. of the total number of bacteria and actinomycetes, living in the plant rhizosphere (Table IV).

Table IV

The frequency of strains able to mineralize organic phosphorus compounds in the rhizosphere of some crop plants. Per cent of total number of microorganisms
Procentowy udział drobnoustrojów mineralizujących organiczne związki fosforu w zespołach mikroflory z rizosfery niektórych roślin uprawnych

Successive stages of plant growth / Kolejne okresy rozwoju rośliny	Oats / Owies		Buckwheat / Gryka		Potatoes / Ziemniaki		Lupine / Łubin		Peas / Groch	
	Years / Lata									
	1965	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1956	1955	1956
1	—	32	—	67	—	55	—	20	—	37
2	44	20	30	31	34	36	42	33	10	35
3	52	19	32	62	14	51	38	37	—	72
4	46	31	14	23	50	25	52	41	28	33

In 1955 the strains mineralizing nucleic acid and glycerophosphate were the most frequent among the associations of microorganisms isolated from the rhizosphere. Microorganisms mineralizing only lecithin appeared very rarely, being more frequent only on the roots of oats, buckwheat and lupine.

In 1956 a considerable growth of similar microorganisms was noted in the rhizosphere of peas, buckwheat and potatoes, especially at the time

of their flowering. Moreover we noted also in the isolated associations, independently of the species and of the age of the plants, a preponderance of microorganisms mineralizing only nucleic acids (Fig. 1). In experi-

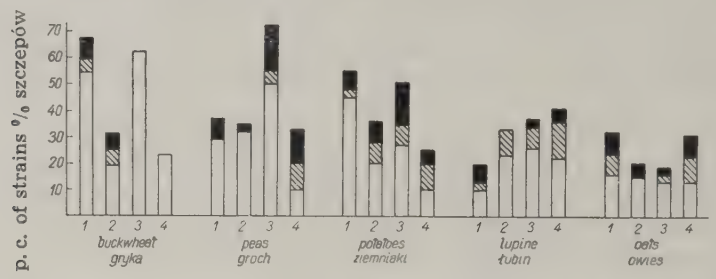


Fig. 1. Microbial populations of microorganisms able to mineralize different organic phosphorus compounds from the rhizosphere of some crop plants (1956)

Rys. 1. Skład zespołów drobnoustrojów zdolnych do mineralizowania różnych organicznych związków fosforu z rizosfery niektórych roślin uprawnych (1956)

yeast nucleic acid
kwas nukleinowy drożdżowy

glycerophosphate
glicerofosfat

yeast nucleic acid and glycerophosphate
kwas nukleinowy drożdżowy i glicerofosfat

Successive stages of plant growth — Kolejne okresy rozwoju rośliny

ments made during 1956 more actinomycetes were found on the roots of buckwheat, potatoes and flax than in 1955. These microorganisms were for the most part able to mineralize only nucleic acid.

CONCLUSIONS

1. The rhizosphere of the observed plants influenced favourably the growth of bacteria and actinomycetes dissolving calcium phosphate and mineralizing organic phosphorus compounds.

2. The most numerous on the root of plants were microrganisms able to dissolve only slowly calcium phosphate. Strains of microorganisms very active in that respect were are.

3. In natural associations of microorganisms, calcium phosphate was usually most vigorously dissolved by microorganisms living on the roots of lupine. Microorganisms from roots of potatoes and flax were much less active.

4. The microorganisms mineralizing organic phosphorus compounds

isolated from plant roots and soil could decompose nucleic acid and glycerophosphate. Only a few of them decomposed lecithin.

The majority of actinomycetes was able to mineralize only nucleic acid.

LITERATURE

Aberson, J. H., 1910: Ein Beitrag zur Kenntnis der Natur der Wurzelausscheidungen, *Jahrb. wiss. Bot.*, **47**: 41.

Czapek, F., 1896: Zur Lehre von den Wurzelausscheidungen, *Jahrb. wiss. Bot.*, **29**: 321.

Czapek, F., 1905: Biochemie der Pflanzen, V. II.

Dietrich, 1862: Agrikulturchemie, V. II.

Gerretsen, F. C., 1948: The influence of microorganisms on the phosphorus intake by the plant. *Plant and Soil*, **1**: 51.

Gołębiowska, J., 1956: A method of investigation of the microbial population playing a part in the transformation of phosphorus compounds in the soil, *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 125.

Gołębiowska, J., 1957: Zastosowanie metody Lochheada do badania rozprzestrzenienia w glebie drobnoustrojów czynnych przy przemianach fosforu. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 17.

Kotelew, W. W., 1955a: Znaczenije mikroflory poczwy w pieredwiżeniju i uswojeniju fosfora rastieniami pri jego oczagowom wniesieniji (metodom P^{32}), *Izd. Mołd. fil. ANSSSR*, **1**: 9.

Kotelew, W. W., 1955b: Postuplenije fosfora P^{32} w kletki mikroorganizmow i pieredacza jego rastieniju, „Izotopy w mikrobiołogii", Izd. ANSSSR.

Kotelew, W. W., Sabielnikowa, W. I., 1955: Wlijanije bakterij minieralizujuszczych organiczeskije sojedinienija fosfora (P^{32}) na uswojenije jego rastienijami, *Izd. Mołd. fil. ANSSSR*, **1**: 3.

Kunze, G., 1906: Über Säureausscheidung bei Wurzeln und Pilzhyphen und ihre Bedeutung, *Jahrb. wiss. Bot.*, **42**: 357.

Lochhead, A. G., Taylor, C. B., 1938: Qualitative studies of soil microorganisms, I. General Introduction, *Canad. J. Res.*, **16** C: 152 (wg J. Gołębiowskiej, 1957).

Nowotny-Mieczyńska, A., Gołębiowska, J., 1956: The influence of microbial population on the phosphorus uptake by some crop plants, *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 129.

Prianisznikow, D. N., 1934: Über das Aufschlissen der Rohphosphate durch die Wurzelausscheidungen von Lupinen, *Phosphorsäure*, **35**: 1.

Rubieńczyk, Ł. I., 1955: Niekotoryje spornyje woprosy o roli poczwiennych mikroorganizmow w pitaniji rastienij, *Mikrobiołogija*, **24**: 229.

Smalij, S. T., 1956: Rol mikroorganizmow rizosfiery w pieredaczy fosfora prorostkam pszenicy, *Mikrobiol. Żurnal*, **18**: 3.

Stoklasa, J., Ernest, A., 1908: Beiträge zur Lösung der Frage der chemischen Natur des Wurzelsekretes, *Jahrb. wiss. Bot.*, **46**: 55.

Własiuk, P. A., Manzon, W. D., 1955: Ob uczasti mikroorganizmow w pitaniji rastienij, *Izw. ANSSSR, ser. biol.*: 49.

Władysław Myśków

ROZPRZESTRZENIENIE W RIZOSFERZE ROŚLIN UPRAWNYCH DROBNOUSTROJÓW URUCHAMIAJĄCYCH FOSFOR

Streszczenie

W pracy tej starano się zbadać, jak licznie występują w rizosferze roślin uprawnych drobnoustroje uruchamiające fosfor z mineralnych i organicznych jego związków. Obserwowano przy tym zmiany w składzie zespołów drobnoustrojów „fosforowych" w strefie korzeniowej roślin zależnie od okresu ich rozwoju.

Z otrzymanych wyników można wnioskować, że rizosfera roślin uprawnych jest dobrym siedliskiem dla rozwoju bakterii i promieniowców rozpuszczających fosforany wapnia lub mineralizujących organiczne związki fosforu. Ilości tych organizmów zmieniały się w naszych badaniach zależnie od rodzaju, wieku rośliny i warunków glebowo-klimatycznych.

Adres autora:
Author's address:
Dr Władysław Myśków,
Zakład Mikrobiologii Gleby IUNG
Puławy,
Polska.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10: 101—107

Alicja Strzelczykowa i *Edmund Strzelczyk*

ANTAGONISTYCZNE ODDZIAŁYWANIE PROMIENIOWCÓW NA AZOTOBAKTERA i *RHIZOBIUM* W ZALEŻNOŚCI OD RÓŻNYCH ŹRÓDEŁ WĘGLA I AZOTU W PODŁOŻU

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej WSR w Lublinie

Wpłynęło dnia 19 października 1959 r.

Streszczenie

Substancje antybiotyczne, wytwarzane przez badane promieniowce silnie hamowały rozwój azotobaktera, wpływały natomiast bardzo słabo na wzrost *Rhizobium*. Najsilniej wyrażone antybiotyczne działanie promieniowców obserwowano na podłożach, zawierających glikozę, skrobię lub mannitol — jako źródło węgla, a asparaginę, azotan potasu lub pepton — jako źródło azotu.

Prace wielu autorów, dotyczące wpływu różnych składników podłoża na aktywność antybiotyczną drobnoustrojów, wskazują na zależność tej cechy od składu pożywki. Rake i Donowick (1946), Ainsworth i współpracownicy (1947) oraz Dulaney (1948) stwierdzili różnice wydajności streptomycyny, zależne od rodzaju źródła azotu w podłożu. Waksman (1947a), hodując promieniowce na agarze odżywczym lub na pożywce agarowej z glikozą i asparaginą, zaobserwował znacznie liczniejsze występowanie szczepów antagonistycznych w stosunku do *B. subtilis* na tym drugim podłożu. Podobne wyniki otrzymali Nickell i Burkholder (1947). Stwierdzili oni, że podanie asparaginy, jako źródła azotu, wzmaga wytwarzanie antybiotyków przez promieniowce. Waksman (1947b) oraz Duda i Kaszubiak (1957) również wykazali zależność wytwarzania antybiotyków przez promieniowce od składu pożywki.

Wyniki licznych badań nad występowaniem promieniowców antagonistycznych wykazały, że w glebach próchnicznych szczepy takie są liczniejsze niż w glebach ubogich w substancje organiczne (Krasilnikow i współpracownicy, 1953). Według Krasilnikowa przyczyną tego zjawiska jest silny rozwój drobnoustrojów w glebach próchnicznych i wytwarzanie się stosunków konkurencyjnych między nimi.

Brian i współpracownicy (1951), Brian (1957) oraz Lochhead

(1952) są zdania, że przyczyną tworzenia się antybiotycznych ras promieniowców jest obecność w glebie większej ilości łatwo przyswajalnej substancji organicznej.

Poznanie wpływu różnych substancji organicznych na aktywność antagonistyczną promieniowców glebowych może przyczynić się do lepszego zrozumienia roli materii organicznej w regulowaniu składu zespołów mikroflory przez tę grupę drobnoustrojów.

BADANIA WŁASNE

Celem naszej pracy było zbadanie wpływu różnych źródeł węgla i azotu w podłożu na siłę antagonistycznego oddziaływania promieniowców glebowych na rozpowszechnione w glebach bakterie — azotobaktera i *Rhizobium*.

W poprzednich naszych badaniach nad wpływem promieniowców antagonistycznych na niektóre bakterie glebowe (Strzelczykowa i Strzelczyk, 1958) stwierdzono, że spośród użytych do badań bakterii glebowych azotobakter okazał się najbardziej, a *Rhizobium* najmniej wrażliwym organizmem na działanie substancji antybiotycznych wytwarzanych przez promieniowce. Z tego też względu w niniejszej pracy użyto tych dwóch rodzajów bakterii.

Poprzednio stwierdziliśmy częściowe lub całkowite zatracanie aktywności antybiotycznej u promieniowców przechowywanych przez dłuższy czas na podłożach sztucznych. Obecnie chcielibyśmy wyjaśnić, czy i jak dalece może zmienić się antagonistyczne oddziaływanie promieniowców na azotobaktera i *Rhizobium* w zależności od składu pożywki.

METODYKA BADAŃ

Do badań wybrano 10 szczepów promieniowców należących do rodzaju *Streptomyces*, które wyodrębniono z lessu bezpośrednio przed rozpoczęciem badań. U wszystkich tych szczepów stwierdzono silniejszą lub słabszą zdolność hamowania rozwoju azotobaktera, lub też *Rhizobium leguminosarum* i *Rh. trifolii*.

Szczepy promieniowców przechowywano na skosach z pożywką syntetyczną zwaną tutaj „podstawową" i mającą skład następujący: glikozy — 5,0 g, KNO_3 — 1,0 g, K_2HPO_4 — 0,5 g, $MgSO_4$ — 0,2 g, $FeSO_4$ — ślady, agaru — 14 g, wody destylowanej — 1 l, *pH* ok. 7,0. Badając wpływ różnych źródeł węgla na aktywność promieniowców, do pożywki podstawowej zamiast glikozy dodawano po 0,5% jednego z następujących związków: fruktoza, sacharoza, maltoza, skrobia, mannitol, mleczan sodu i cytrynian sodu. Wpływ azotu określano, zastępując azotan potasu następującymi związkami: siarczan amonu, asparagina, hydrolizat kazeiny

i pepton, w stężeniu 0,1%. Badane promieniowce hodowano również na pożywce podstawowej bez glikozy i KNO_3 z dodatkiem wyciągu glebowego w ilości 100 ml/l pożywki oraz na wyciągu mięsnym z agarem.

Promieniowce hodowano na tych podłożach przez 5-6 dni w 28°, a następnie badano ich antagonistyczne oddziaływanie na świeżo wyodrębniony z lessu szczep *Azotobacter chroococcum* oraz na szczepy *Rhizobium leguminosarum* (szczep 5) i *Rh. trifolii* (szczep F), pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii IUNG w Puławach. Szczegółowy opis metody hodowli podano w poprzedniej pracy (Strzelczykowa i Strzelczyk 1958).

WYNIKI BADAŃ

Rhizobium

Na wykresach nie umieszczono danych, dotyczących *Rhizobium*, ponieważ rodzaj ten reagował bardzo słabo na działanie promieniowców, a szerokość stref zahamowania wzrostu bakterii brodawkowych nie przekraczała nigdy 3 mm. Pewne, chociaż słabe oddziaływanie antybiotyczne promieniowców na badane szczepy *Rhizobium* obserwowano tylko na pożywkach z glikozą, maltozą, fruktozą i mannitolem. Sacharoza, cytrynian sodu i wyciąg glebowy niweczyły całkowicie antybiotyczny wpływ promieniowców. Spośród badanych źródeł azotu, jedynie asparagina i azotan potasu wpływały stymulująco na antybiotyczną aktywność promieniowców.

Przeprowadzone obserwacje pozwalają przypuszczać, że zbadany szczep *Rh. leguminosarum* jest nieco bardziej wrażliwy na działanie substancji antybiotycznych promieniowców, niż szczep *Rh. trifolii*.

Azotobacter

Wyniki naszych badań nad antagonistycznym oddziaływaniem promieniowców na azotobaktera podają rys. 1 i 2.

Spośród 10 szczepów promieniowców użytych do badań, 7 wpływało silnie hamująco na rozwój tej bakterii, dając strefy hamowania o szerokości 1-20 mm. Pozostałe trzy szczepy były pod tym względem czynne wyłącznie na pożywkach z glikozą i KNO_3 lub z glikozą i asparaginą.

W zależności od rodzaju pożywki, na której hodowano promieniowce, wytwarzane przez nie substancje antybiotyczne działały w silniejszym lub słabszym stopniu na azotobaktera. Na ogół największe strefy hamowania dawały promieniowce hodowane na pożywce z dodatkiem glikozy (rys. 1). Znacznie mniejsze ilości substancji antybiotycznych wytwarzały badane promieniowce na pożywkach z dodatkiem: fruktozy, maltozy, skrobi i mannitolu. Najmniejsze ilości antybiotyków powstawały w obecności sacharozy, a przy dodaniu do pożywek cytrynianu sodu lub wycią-

gu glebowego (w obecności KNO_3) promieniowce zatracały prawie całkowicie zdolność hamowania wzrostu azotobaktera (rys. 1).

Badania nad wpływem różnych źródeł azotu na wytwarzanie przez promieniowce antybiotyków dla azotobaktera przeprowadzono po oko-

Rys. 1. Hamowanie wzrostu azotobaktera przez promieniowce hodowane na pożywce syntetycznej z dodatkiem różnych związków węgla.

Fig. 1. The inhibition of *Azotobacter* growth by streptomycetes cultivated on the synthetic medium with different carbon sources

Źródło węgla — Carbon sources

1 — glikoza	glucose
2 — fruktoza	fructose
3 — sacharoza	saccharose
4 — maltoza	maltose
5 — skrobia	starch
7 — mleczan sodu	mannitol
6 — mannitol	sodium lactate
8 — cytrynian sodu	sodium citrate
9 — wyciąg glebowy	soil extract
— nie badano	not examined

Szerokość strefy zahamowania wzrostu azotobaktera w mm
Inhibition zone of *Azotobacter* growth in mm

ło 2-miesięcznym przechowywaniu szczepów. Stwierdzono u nich znaczne obniżenie się zdolności hamowania azotobaktera w hodowli na pożywce podstawowej (z glikozą i KNO_3) (rys. 1 i 2). Wyniki naszych badań wskazują na silny wpływ asparaginy i azotanu potasu na aktyw-

ność antybiotyczną promieniowców. Obecność w pożywce peptonu wpływała również pobudzająco na wytwarzanie substancji hamujących rozwój azotobaktera przez niektóre szczepy promieniowców (rys. 2). Wyciąg glebowy, dodany do pożywki jako źródło azotu (w obecności glikozy), po-

Rys. 2. Hamowanie wzrostu azotobaktera przez promieniowce hodowane na pożywce syntetycznej z dodatkiem różnych związków azotu

Fig. 2. The inhibition of *Azotobacter* growth by streptomycetes cultivated on the synthetic medium with different nitrogen sources

Źródło azotu — Nitrogen source

a — KNO_3	KNO_3
b — siarczan amonu	ammonium sulphate
c — hydrolizat kazeiny	asparagine
d — asparagina	caseine hydrolysate
e — pepton	peptone
f — wyciąg glebowy	soil extract
— nie badano	not examined

Szerokość strefy zahamowania wzrostu azotobaktera w mm
Inhibition zone of *Azotobacter* growth in mm

wodował u wszystkich promieniowców utratę zdolności wytwarzania substancji antybiotycznych dla azotobaktera (rys. 2). Brak zdolności hamowania azotobaktera wykazały również promieniowce hodowane na pożywce, w której wyciąg glebowy stanowił pożywienie zarówno azotowe, jak węglowe.

Hodowla badanych promieniowców na wyciągu mięsnym z agarem prowadziła do zwiększonego wytwarzania przez te drobnoustroje substancji antagonistycznych dla azotobaktera. Strefy hamowania rozwoju azotobaktera przez promieniowce hodowane na wyciągu mięsnym wynosiły 2-15 mm.

Zaobserwowano też, że aktywność antagonistyczna promieniowców nie była zależna od stopnia rozwoju ich pseudomycelium. Najsłabszy rozwój promieniowców występował na pożywkach z mleczanem sodu lub fruktozą. Mimo to, szczep 5 hodowany na pożywce z mleczanem sodu hamował silniej azotobaktera, niż hodowany na pożywce z mannitolem, na której rósł bardzo obficie. Szczep 15 działał tak samo silnie na azotobaktera na pożywce z fruktozą, jak na podłożu z glikozą. Należy podkreślić, że również Woodruf i Ruger (1948) stwierdzili, że wydajność produkcji antybiotyku przez *Streptomyces griseus* nie zależy od przyrostu masy pseudomycelium.

WNIOSKI OGÓLNE

1. Zdolność promieniowców glebowych do wytwarzania substancji antybiotycznych zależy w dużym stopniu od charakteru pożywienia węglowego i azotowego.

2. Azotobakter był bardzo wrażliwy, *Rhizobium* natomiast odznaczało się dużą opornością na antybiotyki wytwarzane przez użyte do badań promieniowce.

3. Szczególnie duże ilości substancji antybiotycznych dla azotobaktera wytwarzały promieniowce na pożywkach z glikozą, maltozą, mannitolem lub skrobią, w obecności KNO_3 jako źródła azotu. Spośród badanych związków azotowych najsilniej pobudzały promieniowce do wytwarzania antybiotyków dla azotobaktera: asparagina, azotan potasu i pepton. Również wyciąg mięsny bez dodatku innych substancji pokarmowych wpływał stymulująco na wytwarzanie substancji antagonistycznych dla azotobaktera. Różne związki pokarmowe działały jednakże w niejednakowy sposób na wytwarzanie substancji antybiotycznych przez poszczególne szczepy promieniowców. W hodowlach niektórych szczepów promieniowców obserwowano zwiększanie się wytwarzania substancji antybiotycznych, a u innych obniżanie się tej zdolności pod wpływem tej samej substancji pokarmowej dodanej do pożywki.

LITERATURA

Ainsworth, G. C., Brown, A. M., Mardsen, P. S., Smith, P. A., Spilsburg, J. F., 1947: A method for the large scale production of streptomycin by surface culture. *J. gen. Microbiol.*, **1**: 335.

Brian, P. W., Wright, J. M., Stubbs, J., Way, A. M., 1951: Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plants. *Nature*, **167**: 347.

Brian, P. W., 1957: The ecological significance of antibiotic production. Microbial Ecology, 7th Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge Univ. Press.
Duda, J., Kaszubiak, H., 1957: Badania nad wpływem podłoża na aktywność antybiotyczną promieniowców glebowych. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 253.
Dulaney, E. L., 1948: Observations on *Streptomyces griseus*. II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. *J. Bact.*, **56**: 305.
Krasilnikow, N. A., Koreniako, A. I., Artamonowa, O. I., 1953. Raz-prostranienije aktinomycetow antagonistow w poczwach. *Mikrobiołogija*, **22**: 3.
Lochhead, A. G., 1952: Antagonisms between microorganisms in the soil. *Ann. Rev. Microbiol.*, **6**: 185.
Nickell, L. G., Burkholder, P. R., 1947: Inhibition of *Azotobacter* by soil Actinomycetes. *J. Amer. Soc. Agron.*, **9**: 771.
Rake, G., Donowick, R., 1946: Studies on the nutritional requirements of *Actinomyces griseus* for the formation of streptomycin. *J. Bact.*, **51**: 596.
Strzelczykowa, A., Strzelczyk, E., 1958: Wpływ promieniowców antagonistycznych na niektóre bakterie glebowe. *Acta Microbiol. Polon.*, **7**: 283.
Waksman, S. A., 1947a: Certain aspects of the physiology of Actinomycetes. *Leeuvenhoek J. Microbiol. Serol.*, **12**: 50.
Waksman, S. A., 1947b: Microbial antagonisms and antibiotical substances. The Commonwealth Foundation, New York.
Woodruf, H. B., Ruger, M., 1948: Studies on the physiology of a streptomycin producing strain of *Streptomyces griseus* on proline medium. *J. Bact.*, **56**: 355.

Alicja Strzelczykowa and *Edmund Strzelczyk*

EFFECT OF DIFFERENT CARBON AND NITROGEN SOURCES ON THE ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST *AZOTOBACTER* AND *RHIZOBIUM* IN VARIOUS STRAINS OF SOIL STREPTOMYCETES

Summary

Effect of following substances was examined: carbon sources — glucose, fructose, saccharose, maltose, mannitol, starch, sodium lactate, sodium citrate and soil extract; nitrogen sources — potassium nitrate, ammonium sulphate, casein hydrolysate, asparagine, peptone, soil extract and meat extract.

The results of these investigations (see Figs 1 and 2) have shown the favourable influence of glucose, maltose, starch and mannitol on the production of antibiotic substances to *A. chroococcum*. The best nitrogen sources in this respect were: asparagine and potassium nitrate.

Rhizobium was less susceptible than *Azotobacter* to antibiotic substances produced by the investigated strains of *Streptomycetes*. Only mannitol (among the carbon compounds) and asparagine (among the nitrogen compounds) have stimulated the production by streptomycetes of the antibiotic substances active against the nodule bacteria. Even in this case yet the antagonistic effect was insignificant

Adres autorów:
Authors' address:
A. i E. Strzelczykowie,
Zakład Mikrobiologii Rolnej WSR w Lublinie,
Lublin, Króla Leszczyńskiego 9,
Polska.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10: 109—115

Barbara Kaniuga i *Anna Blechert*

PRÓBY BILANSU SACHAROZY W FERMENTACJI DEKSTRANOWEJ. *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* SZCZEPU *L*

Doniesienie 2

Z Zakładu Technologii Fermentacji Przemysłowych
Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie

Wpłynęło dnia 20 kwietnia 1960

Streszczenie

Wśród produktów fermentacji dekstranowej szczepu *L Leuconostoc mesenteroides* znaleziono, obok dekstranu, fruktozy i kwasu mlekowego, nieznaczne ilości glikozy, maltozy i bliżej nie zidentyfikowanych oligo- i polisacharydów.

W poprzedniej pracy (Kaniuga i Blechert, 1958) stwierdzono, że w niektórych fermentacjach dekstranowych prowadzonych przy pomocy *Leuconostoc mesenteroides L* nie można przeprowadzić stechiometrycznego obliczenia wydajności dekstranu na podstawie ilości powstałej fruktozy. W fermentacjach tych suma ilości dekstranu, cukrów redukujących, kwasu mlekowego oraz nie odfermentowanej sacharozy była niższa od ilości sacharozy wprowadzonej przed fermentacją. Ta nie bilansująca się ilość sacharozy mogła być zużywana na tworzenie innych związków. Próba wykrycia tych związków jest tematem niniejszej pracy.

BADANIA WŁASNE

Do prób wybrano kultury wykazujące osłabioną zdolność dekstranotwórczą przy jednoczesnym wytwarzaniu dużej ilości cukrów redukujących. Doświadczenia prowadzono w skali laboratoryjnej, jak w pracy poprzedniej (Kaniuga i Blechert, 1958).

OZNACZENIE DEKSTRANU

Stężenie dekstranu oznaczono w trzech powtórzeniach metodą antronową (Scott i Melvin, 1953) po uprzednim oczyszczeniu brzeczki z cukrów przez dializę. Dializowano poprzez błonę kuprofonową o grubości 10 μ. Pomiary ekstyn-

kcji wykonywano na fotokolorymetrze typu KF-2 Warszawskich Zakładów Aparatury Kontrolnej i Pomiarowej przy filtrze czerwonym.

OZNACZANIE ILOŚCI CUKROWCÓW

Całkowitą ilość cukrowców oznaczano tą samą metodą co dekstran z tą różnicą, że nie przeprowadzano dializy. Uzyskane wyniki wyrażają zawartość cukrowców jako heksozę.

OZNACZANIE FRUKTOZY I GLIKOZY

Dla oznaczeń ilości glikozy i fruktozy w brzeczce dekstranowej zastosowano metodę Kruisheera (Struszyński 1950). Sumę ilości cukrów redukujących oznaczano metodą Luffa-Schoorla (Struszyński 1950). Stężenie fruktozy oznaczano tą samą metodą po uprzednim utlenieniu glikozy jodem. Z różnicy ilości cukrów redukujących i ilości fruktozy obliczano zawartość glikozy.

OZNACZANIE SACHAROZY I KWASOWOŚCI OGÓLNEJ

opisano w poprzedniej pracy (Kaniuga i Blechert 1958).

CHROMATOGRAFICZNE OZNACZANIE FRUKTOZY WOLNEJ I ZWIĄZANEJ W OCZYSZCZONYM DEKSTRANIE

Dekstran z fermentującej brzeczki wytrącano etanolem w stosunku 1 : 1, następnie rozpuszczano w wodzie, tak aby stężenie dekstranu wynosiło około 2%. Rozpuszczanie i wytrącanie powtarzano trzykrotnie. Tak oczyszczony preparat posiada około 0,04% popiołu i około 0,02% azotu bakteryjnego, pochodzącego z zaadsorbowanych w masie dekstranowej bakterii.

Oczyszczony dekstran podsuszano pod zmniejszonym ciśnieniem w 50°, następnie rozcierano i dosuszano w 105°, a wreszcie nad P_2O_5 do stałego ciężaru.

W celu oznaczenia fruktozy postępowano wg Wise i współpr. (1955). W tych warunkach uwalnia się fruktoza z łatwo hydrolizujących połączeń, a mianowicie cząsteczki fruktozy na końcach łańcucha dekstranu, a także z lewanu i sacharozy.

Roztwór oddzielano od osadu przez odwirowanie, zdekantowanie i odsączenie na sączku szklanym G_4. Alkohol oddestylowywano pod zmniejszonym ciśnieniem w 30 - 40°. Resztę płynu po przeniesieniu do parownicy odparowywano, pozostałość rozpuszczano w 1 ml wody destylowanej, z tego 10 µl nanoszono na bibułę Whatman nr 1 i rozwijano techniką wstępującą przez trzy doby, używając układu rozpuszczalników dobrze rozdzielającego fruktozę od sacharozy i glikozy (Giovannozzi-Sermanni 1956) o składzie: alkohol n-propylowy, alkohol benzylowy, woda, kwas mrówkowy 85% (50 : 72 : 20 : 20).

Wartości R_f dla tych trzech cukrów wynoszą: sacharoza 0,17, glikoza 0,20, fruktoza 0,32.

Rozwinięty chromatogram po wysuszeniu spryskiwano bardzo czułym wywoływaczem, wykrywającym 4 γ fruktozy: (100 ml 1 M kwasu fosforowego w butanolu nasyconym wodą, 3 g mocznika, około 5 ml alkoholu etylowego).

W celu oznaczenia wolnej fruktozy postępowano jak przy oznaczeniu fruktozy ogólnej, pomijając jedynie hydrolizę. Z różnicy oznaczeń fruktozy ogólnej i wolnej obliczano fruktozę związaną.

PRZYGOTOWANIE BRZECZKI DO BADAŃ CHROMATOGRAFICZNYCH

Z fermentującej brzeczki dekstran wytrącono etanolem dodanym w stosunku 1 : 10. Płyn po oddzieleniu od osadu pięciokrotnie zagęszczano przez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie liofilizowano w kilku probówkach w celu przechowania do dalszej pracy. Przed sporządzeniem chromatogramu zliofilizowaną substancję rozpuszczano w wodzie destylowanej w ilości równej połowie płynu pobranego do liofilizacji.

CHROMATOGRAFICZNE ROZDZIELENIE WIELOCUKRÓW W BRZECZCE PO FERMENTACJI

Na bibułę Whatman nr 1 nanoszono 10 - 30 µl przygotowanego roztworu. Rozwijano techniką wstępująco-spływową przez trzy doby, używając układu rozpuszczalników stosowanego do rozdzielenia wielocukrów (B a i l e r i współpr., 1957a) o składzie: butanol, etanol, woda, amoniak (40 : 12 : 20 : 1). Do wywoływania chromatogramu używano amoniakalnego roztworu azotanu srebra i odczynnika naftorezorcynowego (O p i e ń s k a - B l a u t h, 1957).

CHROMATOGRAFICZNE ROZDZIELENIE FRUKTOZY I GLIKOZY W BRZECZCE PO FERMENTACJI

Do rozwijania chromatogramów stosowano układ rozpuszczalników jak przy oznaczeniu fruktozy w oczyszczonym dekstranie. Chromatogramy wywoływano amoniakalnym roztworem azotanu srebra.

IDENTYFIKACJA KWASÓW ORGANICZNYCH ZA POMOCĄ CHROMATOGRAFII

Chromatogramy rozwijano, stosując następujący układ rozpuszczalników: III-rzędowy butanol, alkohol benzylowy, woda, 90-procentowy kwas mrówkowy (5 : 15 : 2 : 1) (O p i e ń s k a - B l a u t h, 1957). Do wywoływania używano zieleni bromokrezolowej (0,04% roztwór alkoholowy).

CHROMATOGRAFICZNE WYKRYWANIE MANNITOLU I GLICEROLU W BRZECZCE

Stosowano metodę C e r b u l i s a (1955), używając następujących rozpuszczalników: n-propanol, octan etylu, woda (2 : 2 : 1). Chromatogramy wywoływano p-anizydyną.

WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

Duża ilość cukrów redukujących nasuwała przypuszczenie, że obok fruktozy w podłożu fermentacyjnym może występować glikoza. W celu sprawdzenia tego przypuszczenia, oprócz cukrów redukujących oznaczano oddzielnie fruktozę i glikozę.

Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli I. Jak widać, w badanych fermentacjach obok fruktozy występuje w różnych ilościach glikoza. Dwa te cukry rozdzielono również przy pomocy chromatografii bibułowej. W tych próbach, w których obok fruktozy występuje w brzeczce glikoza, proces powstawania dekstranu jest zmieniony.

Tabela I

Analiza chemiczna brzeczki po fermentacji, oznaczenia w procentach (początkowa zawartość sacharozy w brzeczce 10%)

Chemical analysis of medium after dextran fermentation, contents in p. c. (concentration of saccharose before fermentation — 10 p. c.)

Nr fermentacji Fermentation No	Sacharoza Saccharose	Cukry redukujące Reducing substances	Fruktoza Fructose	Glikoza Glucose	Różnica stężeń: fruktoza-glikoza Difference of concentrations: fructose-glucose	Dekstran Dextran			Kwas mlekowy Lactic acid
						obliczony calculated	znaleziony assayed	różnica difference	
1	0,10	6,27	4,15	2,12	2,03	1,83	1,91	—0,08	0,21
2	0,00	5,68	3,84	1,84	2,00	1,80	2,54	—0,74	0,25
3	0,00	5,98	3,84	2,14	1,70	1,53	1,85	—0,32	0,22
4	0,14	5,63	4,03	1,06	2,97	2,67	2,96	—0,29	0,27
5	0,04	5,79	3,84	1,95	1,89	1,70	3,06	—1,36	0,23
6	0,01	5,57	4,22	1,35	2,87	2,60	3,08	—0,48	0,21
7	0,09	5,15	4,48	0,67	3,81	3,43	3,22	+0,21	0,30
8	0,34	5,00	4,85	0,14	4,71	4,24	3,93	+0,31	0,24
9	0,17	4,87	3,30	1,56	1,74	1,57	3,19	—1,62	0,17
10	0,13	5,00	4,21	0,84	3,37	3,03	3,74	—0,34	0,16
11	0,07	4,70	4,00	0,68	3,32	2,99	3,87	—0,33	0,28
12	1,14	4,46	4,16	0,28	3,88	3,49	3,30	+0,19	0,18
13	6,30	1,85	1,85	0,00	1,85	1,66	1,50	+0,16	0,16
14	4,80	3,74	1,86	1,88	—0,02	—	0,82	—0,84	0,29
15	4,80	3,53	1,96	1,57	0,39	0,35	0,94	—0,59	0,25

W celu znalezienia ilości dekstranu na podstawie oznaczeń ilości fruktozy trzeba od ilości fruktozy odjąć ilość glikozy. Tak skorygowane obliczenie nie daje jednak nadal drobnych wyników (tabela I). Różnice między rzeczywistą ilością dekstranu a ilością obliczoną są niekiedy dość znaczne.

Próby bilansu użytej sacharozy, przedstawione w tabeli II, potwierdzają wyniki otrzymane w części I pracy. Ilość niebilansującej się sacharozy w zbadanych fermentacjach waha się od 0,2 do około 2,15%.

W celu sprawdzenia czy w brzeczce dekstranowej nie występują inne kwasy organiczne, mannitol i glicerol, przeprowadzono odpowiednie próby. Nie wykryto jednak innych kwasów organicznych ani glicerolu lub mannitolu.

Ze względu na to, że w niektórych fermentacjach ilość dekstranu obliczona na podstawie oznaczeń fruktozy (tabela I) była mniejsza od jego ilości rzeczywistej — uwzględniono możliwość powstawania lewanu i przyłączenia fruktozy do cząsteczki dekstranu jako łatwo hydrolizują-

Tabela II

Bilans sacharozy w poszczególnych fermentacjach (w %)
(początkowe stężenie sacharozy — 10%
Saccharose balance in dextran fermentation (p. c.)
(saccharose concentration before fermentation — 10 p. c.)

Nr fermentacji Fermentation No	Dekstran × 1,06 Dextran × 1,06	Cukry redukujące × 0,95 Reducing sugars × 0,95	Niedofermentowana sacharoza Saccharose final	Kwas mlekowy × 0,95 Lactic acid × 0,95	Suma Total	Nie bilansująca się sacharoza Saccharose not accounted for
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)=(2)+(3)+(4)+(5)	(7)
1	2,02	5,96	0,10	0,20	8,28	1,72
2	2,69	5,39	0,00	0,23	8,31	1,69
3	1,96	5,68	0,00	0,21	7,85	2,15
4	3,14	5,35	0,14	0,25	8,88	1,12
5	3,24	5,50	0,04	0,21	8,99	1,01
6	3,26	5,29	0,01	0,21	8,77	1,23
7	3,41	4,89	0,09	0,28	8,67	1,33
8	4,17	4,75	0,34	0,23	9,49	0,51
9	3,38	4,63	0,17	0,16	8,34	1,66
10	3,96	4,75	0,13	0,15	8,99	1,01
11	4,10	4,47	0,07	0,27	8,91	1,09
12	3,50	4,24	1,14	0,17	9,05	0,95
13	1,59	1,76	6,30	0,15	9,80	0,20
14	0,87	3,55	4,80	0,27	9,49	0,51
15	1,00	3,35	4,80	0,23	9,38	0,62

cej końcowej jednostki. W 100 g oczyszczonego dekstranu znaleziono około 0,015% fruktozy ogółem i około 0,005% wolnej. Na fruktozę związaną przypada zatem około 0,01%, co w przeliczeniu na zawartość jej w brzeczce wynosi około 0,0003%. Dane te są średnią z trzech preparatów dekstranu pochodzących z różnych fermentacji. Jak widać, ilość fruktozy w postaci lewanu, bądź łatwo hydrolizującej końcowej jednostki dekstranu, jest znikoma i nieistotna przy obliczeniach bilansu sacharozy.

W celu stwierdzenia, czy w brzeczce pofermentacyjnej występują inne węglowodany, niż dotychczas oznaczane, zastosowano rozdział chromatograficzny w celu ich wykrycia. Zbadano produkty czterech fermentacji. We wszystkich przypadkach wykryto, obok glikozy, maltozę oraz cukrowiec o $R_{glikozy}$: 0,3-0,4. Bailer i współpr. (1957b) podają $R_{glikozy}$: 0,4 dla trójsacharydu:

Glu /1 → 6/-Glu /1 → 2/-Fru

Autorzy ci w innej pracy (1957a) stwierdzili, że przy zastosowaniu tego samego układu rozpuszczalników $R_{glikozy}$ dla izomaltozy wynosi 0,37. Bliższa identyfikacja wykrytego przez nas związku była niemożliwa ze względu na brak odpowiednich wzorców. W produktach jednej fermentacji wykryto oprócz tego związki o $R_{glikozy}$ około 0,2 i około 0,1, co wg Bailera (1957b) odpowiada cztero- i pięciocukrom. Badania te potwierdziły przypuszczenie, że w brzeczce po fermentacji obok dekstranu występują inne oligo- lub polisacharydy.

Wobec tego do obliczenia bilansu sacharozy wprowadzono oznaczenie sumy ilości węglowodanów w brzeczce dekstranowej. Wyniki tych oznaczeń przedstawia tabela III. Jak widać z przeliczeń, oprócz dekstranu, cukrów redukujących i sacharozy inne węglowodany występują we wszystkich badanych fermentacjach.

Tabela III

Bilans sacharozy z uwzględnieniem oznaczenia innych węglowodanów (w %)
Saccharose balance corrected for other saccharides formed in dextran fermentation (p. c.)

Nr fermentacji Fermentation No	Sacharoza początkowa · 0,95 Saccharose before fermentation × 0,95	Dekstran ·0,9 Dextran ×0,9	Cukry redukujące Reducing sugars	Nieodfermentowana sacharoza ×0,95 Saccharose final ×0,95	Kwas mlekowy Lactic acid	Inne węglowodany Other oligo and polisaccharides	Suma Total	Różnica: sacharoza początkowa — produkty końcowe Difference; saccharose before fermentation — final products
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
12	10,53	3,67	4,46	1,20	0,18	1,07	10,58	−0,05
13	10,53	1,67	1,85	6,52	0,16	0,26	10,46	+0,07
14	10,53	0,91	3,74	5,05	0,29	0,50	10,49	+0,04
15	10,53	1,03	3,53	5,05	0,25	0,74	10,50	+0,03

Ilość brakującej sacharozy, obliczonej na podstawie oznaczeń dekstranu, cukrów redukujących, nieodfermentowanej sacharozy i kwasu mlekowego (tabela II) jest prawie identyczna ze znalezioną ilością maltozy i wyższych węglowodanów (tabela III). Można więc wnioskować, że przy biosyntezie dekstranu, prowadzonej przy pomocy *L. mesenteroides* szczep *L*, oprócz dekstranu, fruktozy i kwasu mlekowego, powstają: glikoza, maltoza oraz wyższe wielocukry.

LITERATURA

Bailer, R. W., Barker, S. A., Bowene, E. J., Stacey, M., 1957a: Immunopolysaccharides. Part VII. The transglucosylase action of *Betacoccus arabinosaceus* dextranosucrase. *J. Chem. Soc.*: 3536.

Bailer, R. W., Barker, S. A., Bowene, E. J., Stacey, M., Theander, O., 1957b: Significance of oligosacharide intermediates in dextran synthesis. *Nature*. **179**: 310.

Cerbulis, J., 1955: Paper chromatography of sugar alcohols and their glycosides. *Anal. Chem.*, **27**: 1400.

Giovannezzi-Sermanni, G., 1956: A new solvent for quantitative paper chromatography of sugars. *Nature*. **177**: 586.

Kaniuga, B., Blechert, A., 1958: Próby bilansu sacharozy w fermentacji dekstranowej prowadzonej przy pomocy szczepu *Leuconostoc mesenteroides*. *Acta Microbiol. Polon.*, **7**: 131.

Opieńska-Blauth, J., 1957: Chromatografia. PWN, Warszawa.

Scott, T. A., Melvin, E. H., 1953: Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chem.*, **25**: 1956.

Struszyński, M., 1950: Analiza ilościowa i techniczna, t. III, PWN, Warszawa.

Wise, C. S., Dimler, R. J., Davis, H. A., Rist, C. E., 1955: Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparations. *Anal. Chem.*, **28**: 33.

Barbara Kaniuga and *Anna Blechert*

SACCHAROSE BALANCE IN DEXTRAN FERMENTATION BY STRAIN *L LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*

Summary

The experiments were conducted on the strain *L* of *Leuconostoc mesenteroides*, characterized by low dextran yield.

The final products of the process were identified and assayed. Among these products dextran, fructose, glucose, lactic acid and maltose were identified. There were found by paper chromatography also some oligosaccharides and polisaccharides.

When these saccharides were taken into consideration 99,4 p. c. of saccharose was accounted for in final products (Tables I—III).

Adres autorów:
Authors' address:
Barbara Kaniuga,
Anna Blechert
Instytut Przemysłu Fermentacyjnego,
Warszawa, Rakowiecka 8,
Polska

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, **10** : 117—118

KRÓTKIE KOMUNIKATY — SHORT ARTICLES

Józef Zwierz i *Krystyna Karmańska*

OBSERWACJE NAD WYSTĘPOWANIEM „GNIAZD LĘGOWYCH" W HODOWLACH LEPTOSPIR

Komunikat

Z Zakładu Badań nad Leptospirozą Instytutu Weterynarii we Wrocławiu

Otrzymano 30 listopada 1960 r.

Obserwowane przez nas tzw. „gniazda lęgowe" swoim wyglądem odpowiadają na ogół opisowi Schüffnera i Mochtara (*Zent. Bakter.-O.*, I, 1927, **101**: 405). Są to prawie kuliste skupiska leptospir o utkaniu luźniejszym niż ma to miejsce w konglomeratach występujących w reakcji aglutynacji. Skupiska te odznaczają się żywym ruchem, tzn. dzięki bardzo żywemu ruchowi końców poszczególnych leptospir (tkwiących swym drugim końcem w gnieździe lęgowym) gniazdo również wędruje. Wielkość obserwowanych gniazd lęgowych jest różna, przeważają jednak skupiska nieduże, o średnicy ca 10 μ. Niekiedy można zauważyć gniazda bardzo małe, kształt ich wtedy jest najczęściej nieregularny ale pomylić je z aglutynacją jest raczej trudno ze względu na wspomniany już żywy ruch.

Czasami wokół gniazda lęgowego ilość leptospir wolnych jest znacznie większa niż w pozostałej części pola widzenia; stwarza to jakby strefę wzmożonego wzrostu — zjawisko to łatwiej jest zauważyć w szczepach jeszcze niewyrośniętych.

Gniazda lęgowe występują na ogół w hodowlach młodych (w kilka dni po przesiewie). W hodowlach tych leptospiry wolne odznaczają się bardzo żywym ruchem, przy czym ilość ich z każdym dniem się zwiększa, a więc szczep znajdowałby się w fazie intensywnego wzrostu. Ilość gniazd lęgowych w hodowli zmniejsza się w miarę jej wzrostu i wieku. W hodowlach 3-tygodniowych spotyka się je znacznie rzadziej, w hodowlach

starszych znikają zupełnie. Oczywiście czas znikania pozostaje w ścisłym związku ze sposobem hodowania szczepów (rodzaj pożywki, temperatura, w jakiej odbywa się wzrost).

Przedstawione obserwacje dotyczą występowania gniazd lęgowych w szczepach, które są pasażowane od dłuższego czasu. Natomiast jeżeli chodzi o szczepy świeżo izolowane, zachodzą tu pewne różnice. Szczepy te, po okresie przystosowania się do podłoża, wykazują dużą żywotność, a okres występowania w nich gniazd lęgowych może dotyczyć późniejszego wzrostu. Dla przykładu podajemy: szczep *x*, pasaż 2 (wysiano z pasażu pierwszego, 9-dniowego, którego stan był następujący: kilka leptospir w polu widzenia), data wysiania 10. X:

Data	Ilość Leptospiry	Liczba gniazd lęgowych (w polu widzenia)
24. X	kilka	—
27. X	+	—
30. X	+++	7—8
2. XI	++++	2—3
3. XI	++++	0—1
7. XI	+++	1 -2
12. XI	++	brak
16. XI	++	
24. XI	+	
20. XII	+	

Według naszych spostrzeżeń hodowle przesiewane w okresie, gdy znajdują się w nich gniazda lęgowe, rosną bardzo dobrze. Chcąc uzyskać duże ilości hodowli w określonym czasie (co w pracach jest niekiedy konieczne) posługiwaliśmy się więc wyłącznie takimi hodowlami, otrzymując niekiedy kilkanaście kolejnych, szybko rosnących (3-5 dni w temperaturze 37°C) przesiewów. W tym przypadku chodziło jednak o szczep świeżo izolowany, natomiast w szczepach pasażowanych dłużej gniazda lęgowe nie zawsze pojawiają się w następnych przesiewach.

Reasumując dotychczasowe wyniki obserwacji, można sądzić, że gniazda lęgowe są w pewnym stopniu wykładnikiem żywotności i intensywności wzrostu danej hodowli.

Adres autorów:
Authors' address:
Prof. dr J. Zwierz,
Zakład Badań nad Leptospirozą IW
Wrocław, Rodakowskiego 6
Polska

INFORMACJA DLA MUZEÓW SZCZEPÓW DROBNOUSTROJÓW

Na prośbę Dr C.-G. Hedéna, Sekretarza Generalnego Międzynarodowego Związku Towarzystw Mikrobiologicznych (IAMS) Redakcja zamieszcza poniższy list IAMS (w tłumaczeniu polskim):

„Kolekcje drobnoustrojów istnieją w wielu krajach świata; niektóre są finansowane przez instytucje rządowe, inne przez uniwersytety lub instytuty naukowe. Wiele z nich posiada skromny budżet i mogłyby zwiększyć usługi przez siebie świadczone, jeśliby rozporządzały większymi dochodami. Niektóre kolekcje pobierają opłaty za kultury, inne wysyłają je gratisowo.

Kolekcje szczepów, zwłaszcza wyspecjalizowane kolekcje, posiadające szczepy niedostępne gdzie indziej, często mają znaczenie międzynarodowe, udostępniając te szczepy i specjalne informacje pracownikom innych krajów. Ponoszą przy tym koszta, których pokrycie często natrafia na trudności. Komitet Wykonawczy Międzynarodowego Związku Towarzystw Mikrobiologicznych (IAMS) spełnia rolę ciała doradczego przy rozdziale funduszy, jakie są do dyspozycji, w celu poparcia międzynarodowej działalności takich kolekcji. Fundusze są obecnie ograniczone. Aby jednak Komitet mógł spełniać należycie swoją doradczą rolę, jest niezbędne by IAMS rozporządzał szczegółami, dotyczącymi kolekcji obecnie rozsyłających szczepy w ten sposób, łącznie z informacjami o ich stanie finansowym i zewnętrznymi dotacjami.

Proponujemy dlatego, aby kuratorzy lub dyrektorzy muzeów szczepów powiadomili Sekretarza Komitetu Wykonawczego IAMS (Dr C.-G. Hedén, Karolinska Institutet, Stockholm 60, Szwecja) o ich kolekcjach podając: cel kolekcji, typy i ilość organizmów, specjalne zainteresowanie (np. bakteriologia lekarska, fermentacje przemysłowe itd.), czy dostarczanie kultur jest płatne, ogólny stan finansowy muzeum (czy subsydiowane przez państwo, przemysł itd.), stopień zainteresowania międzynarodowego ich kolekcją, w jakim stopniu nie są w stanie sprostać żądaniom międzynarodowym z powodu kosztów, jakie to pociągnęłoby za sobą.

Informacje te powinny dotrzeć do Biura IAMS w Sztokholmie przed 15 maja 1961 r., jeśli miałyby być rozważane w tym roku."

Wszyscy zainteresowani powinni w tej sprawie zwrócić się do Przewodniczącego Komisji Kolekcji Szczepów Komitetu Mikrobiologicznego Polskiej Akademii Nauk, prof. Dra H. Meisla (Warszawa, Chocimska 24).

SPIS TREŚCI — CONTENTS

1. H. Krzemieniewska: *Acrasieae*. Szkic monograficzny . . . 3
2. K. Włodarczak i J. Jeljaszewicz: Badania nad koagulazami gronkowcowymi. IV. Zachowanie się gronkowców w normalnych surowicach bez dodatku i z dodatkiem wolnej koagulazy
Studies on staphylococcal coagulase. IV. Growth of staphylococci in normal sera with and without added coagulase. 81
3. W. Myśków: The occurrence of microorganisms solubilising phosphorus in the rhizosphere of some crop plants
Rozprzestrzenienie w rizosferze roślin uprawnych drobnoustrojów uruchamiających fosfor 93
4. A. Strzelczykowa i E. Strzelczyk: Antagonistyczne oddziaływanie promieniowców na azotobaktera i *Rhizobium* w zależności od różnych źródeł węgla i azotu w podłożu
Effect of different carbon and nitrogen sources on the antagonistic activity against *Azotobacter* and *Rhizobium* in various strains of soil streptomycetes. 101
5. B. Kaniuga i A. Blechert: Próby bilansu sacharozy w fermentacji dekstrancwej *Leuconostoc mesenteroides* szczepu *L*
Saccharose balance in dextran fermentation by strain *L Leuconostoc mesenteroides* 109

KRÓTKIE KOMUNIKATY — SHORT ARTICLES

J. Zwierz i K. Karmańska: Obserwacje nad występowaniem „gniazd lęgowych" w hodowlach leptospir. 117
Informacja dla muzeów szczepów drobnoustrojów 119

Warunki prenumeraty kwartalnika

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

Cena w prenumeracie zł 100,— rocznie
zł 50,— półrocznie

Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Przedsiębiorstwo Upowszechniania Prasy i Książki „Ruch" Wrocław, ul. Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768
2. Urzędy pocztowe
3. Księgarnie „Domu książki"

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100-024.

Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" oraz w Ośrodku Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych Polskiej Akademii Nauk — Wzorcownia Wydawnictw Naukowych PAN — Ossolineum — PWN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter).

Tylko prenumerata zapewnia regularne otrzymywanie czasopisma

Cena zł 25.—

Wydawane z zasiłku
POLSKIEJ AKADEMII NAUK